

Cyclische Nucleotide in der Mucosa des adaptierenden Rattencaecums

Rupert Gerzer

1977

Aus der Medizinischen Klinik Innenstadt der Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Cyclische Nucleotide
in der Mucosa des adaptierenden Rattencaecums

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Rupert Gerzer

aus

Gars am Inn

1977



Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. K. Loeschke

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. E. Buchborn

Dekan: Prof. Dr. med. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 1.12.1977

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Seite

1.1	Einleitung	1
1.2	1.1.1 Die Bedeutung der Eltern	2
1.3	1.1.2 Die Rolle der Eltern	3
1.4	1.1.3 Die Verantwortung der Eltern	4
1.5	1.1.4 Die Liebe der Eltern	5
1.6	1.1.5 Die Erziehung der Eltern	6
1.7	1.1.6 Die Unterstützung der Eltern	7
1.8	1.1.7 Die Anerkennung der Eltern	8
1.9	1.1.8 Die Wertschätzung der Eltern	9
1.10	1.1.9 Die Ehrfurcht vor den Eltern	10
1.11	1.1.10 Die Dankbarkeit gegenüber den Eltern	11
1.12	1.1.11 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	12
1.13	1.1.12 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	13
1.14	1.1.13 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	14
1.15	1.1.14 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	15
1.16	1.1.15 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	16
1.17	1.1.16 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	17
1.18	1.1.17 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	18
1.19	1.1.18 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	19
1.20	1.1.19 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	20
1.21	1.1.20 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	21
1.22	1.1.21 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	22
1.23	1.1.22 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	23
1.24	1.1.23 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	24
1.25	1.1.24 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	25
1.26	1.1.25 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	26
1.27	1.1.26 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	27
1.28	1.1.27 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	28
1.29	1.1.28 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	29
1.30	1.1.29 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	30
1.31	1.1.30 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	31
1.32	1.1.31 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	32
1.33	1.1.32 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	33
1.34	1.1.33 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	34
1.35	1.1.34 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	35
1.36	1.1.35 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	36
1.37	1.1.36 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	37
1.38	1.1.37 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	38
1.39	1.1.38 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	39
1.40	1.1.39 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	40
1.41	1.1.40 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	41
1.42	1.1.41 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	42
1.43	1.1.42 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	43
1.44	1.1.43 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	44
1.45	1.1.44 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	45
1.46	1.1.45 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	46
1.47	1.1.46 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	47
1.48	1.1.47 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	48
1.49	1.1.48 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	49
1.50	1.1.49 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	50
1.51	1.1.50 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	51
1.52	1.1.51 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	52
1.53	1.1.52 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	53
1.54	1.1.53 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	54
1.55	1.1.54 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	55
1.56	1.1.55 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	56
1.57	1.1.56 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	57
1.58	1.1.57 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	58
1.59	1.1.58 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	59
1.60	1.1.59 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	60
1.61	1.1.60 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	61
1.62	1.1.61 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	62
1.63	1.1.62 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	63
1.64	1.1.63 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	64
1.65	1.1.64 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	65
1.66	1.1.65 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	66
1.67	1.1.66 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	67
1.68	1.1.67 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	68
1.69	1.1.68 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	69
1.70	1.1.69 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	70
1.71	1.1.70 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	71
1.72	1.1.71 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	72
1.73	1.1.72 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	73
1.74	1.1.73 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	74
1.75	1.1.74 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	75
1.76	1.1.75 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	76
1.77	1.1.76 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	77
1.78	1.1.77 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	78
1.79	1.1.78 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	79
1.80	1.1.79 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	80
1.81	1.1.80 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	81
1.82	1.1.81 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	82
1.83	1.1.82 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	83
1.84	1.1.83 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	84
1.85	1.1.84 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	85
1.86	1.1.85 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	86
1.87	1.1.86 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	87
1.88	1.1.87 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	88
1.89	1.1.88 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	89
1.90	1.1.89 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	90
1.91	1.1.90 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	91
1.92	1.1.91 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	92
1.93	1.1.92 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	93
1.94	1.1.93 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	94
1.95	1.1.94 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	95
1.96	1.1.95 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	96
1.97	1.1.96 Die Erziehung und Unterstützung der Eltern	97
1.98	1.1.97 Die Anerkennung und Wertschätzung der Eltern	98
1.99	1.1.98 Die Ehrfurcht und Dankbarkeit gegenüber den Eltern	99
1.100	1.1.99 Die Liebe und Dankbarkeit der Eltern	100

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	1
1.1 Adaptationsprozesse am Warmblüterdarm	1
1.2 Modell der diätetischen Adaptation am Caecum der Ratte	2
1.3 Cyclische Nucleotide	4
1.4 Cyclische Nucleotide und Wachstum	9
1.5 Cyclische Nucleotide und Elektrolyttransport	11
1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit	14
2 <u>Methodik</u>	15
2.1 Tierhaltung	18
2.2 In vivo-Versuche	18
2.2.1 Entnahme der Mucosa	18
2.2.1.1 Sofortentnahme	19
2.2.1.2 Entnahme nach 2 h Resorption	19
2.3 In vitro-Versuche	20
2.3.1 Flußkammer zur Messung elektrischer Parameter	20
2.3.2 Versuchsablauf	22
2.4 Bestimmung von cAMP und cGMP in der Schleim- haut	25
2.4.1 Trennung von cAMP und cGMP	25
2.4.1.1 Trennung mittels QAE Sephadex A 25-Säulen	25
2.4.1.2 Trennung mittels Aluminiumoxyd- und Dowex 1 x 2-Säulen	29
2.4.2 Ausbeutebestimmung	32
2.4.3 Bestimmung von cAMP	32
2.4.3.1 Präparation des Bindungsproteins	32
2.4.3.2 cAMP-Bestimmung nach GILMAN	36
2.4.3.3 cAMP-Bestimmung nach BROSTROM	39
2.4.4 cGMP-Bestimmung mittels Radioimmunoassay	41
2.5 Proteinbestimmung nach LOWRY	44
2.6 Berechnung der Endwerte, statistische Auswertung	46

	Seite
2.7.1	verwendete Geräte 47
2.7.2	verwendete Reagentien 48
3	<u>Ergebnisse</u> 50
3.1	in vivo-Versuche 50
3.1.1	Bestimmung der optimalen Entnahmezeit 50
3.1.2	cAMP-Gehalt in der normalen und adaptierenden Caecumschleimhaut 51
3.1.2.1	Vergleich von Sofortentnahme und Entnahme nach Resorption 53
3.1.3	cGMP im normalen und adaptierenden Caecum 55
3.2	in vitro-Versuche 58
3.2.1	Vorversuche 58
3.2.2	Elektrische Parameter vor und nach Theophyllin 60
3.2.3	Cyclische Nucleotide vor und nach Theophyllin 65
3.2.3.1	cAMP 66
3.2.3.2	cGMP 67
4	<u>Diskussion</u> 70
4.1	zur Methodik 70
4.1.1	Gewebeentnahme 70
4.1.2	Vergleich der Trennungsmethoden von cAMP und cGMP 72
4.1.3	Bestimmungsmethoden von cAMP und cGMP 72
4.2	zu den Ergebnissen 74
4.2.1	cyclische Nucleotide in der normalen und adaptierten Caecumschleimhaut in vivo 74
4.2.1.1	cAMP 74
4.2.1.2	cGMP 75
4.2.2	cyclische Nucleotide und elektrische Parameter in vitro 77
4.2.2.1	cAMP 77
4.2.2.2	cGMP 77
4.2.2.3	elektrische Parameter 79
4.2.3	Änderung cyclischer Nucleotide bei der Adaptation 81

	Seite
4.2.3.1 Möglicher Zusammenhang mit dem Wachstum	81
4.2.3.2 Möglicher Zusammenhang mit dem Elektrolyt-transport	83
5 <u>Zusammenfassung</u>	88
6 <u>Literaturverzeichnis</u>	91

1 Einleitung

1.1 Adaptationsprozesse am Warmblüterdarm

Die Epithelien des Magen-Darmkanals erneuern sich bei Warmblütern in 3 - 5 Tagen (91). Damit gehört der Darm zu den Geweben mit der schnellsten Zellumsatzrate. Beobachtungen an Menschen und Tieren haben gezeigt, daß sich die Darmschleimhaut nicht nur schnell erneuert, sondern ihre Zellmasse auch in kurzer Zeit speziellen Bedürfnissen anpassen kann. So kommt es bei Hyperphagie, nach partieller Resektion, Transposition oder Ausschaltung von Darmschlingen (30,56,64,95,97,102,146,152) in kurzer Zeit zu einem Wachstum der resorbierenden Schleimhaut, wobei vor allem die Zellzahl, nicht aber die Einzelzelle sich vergrößert.

Aber auch die Möglichkeit einer funktionellen Anpassung von Darmschleimhautzellen an spezifische Erfordernisse ist nachgewiesen (88,90) und teilweise sogar zu therapeutischen Zwecken genutzt worden. So zeigte sich bei einem Fall angeborener Saccharase-Isomaltase-Intoleranz, daß eine fructosereiche Diät die spezifische Aktivität der Saccharase des Dünndarms bis auf das Vierfache steigern konnte (55). Auch die spezifischen Aktivitäten der Maltase und glycolytischer Enzyme im Jejunum passen sich der aufgenommenen Nahrung an (115,116,117,141). Fehlt diese Eigenschaft, ist klinisch sogar von einem "Maladaptationssyndrom" gesprochen worden (115).

Eine der wichtigsten Funktionen des Darms ist die Resorption von Elektrolyten und Wasser. Über Adaptationen des intestinalen Elektrolyttransports ist bisher wenig bekannt. Immerhin konnte kürzlich gezeigt werden, daß eine kaliumreiche Diät im Colon von Ratten eine Steigerung der spezifischen Aktivität der Natrium-Kalium-stimulierten Adenosintriphosphatase (Na-K-ATPase), der Kaliumsekretion, nicht aber der Natriumresorption und der transmuralen elektrischen Potentialdifferenz induziert (43,136). Eine Steigerung des gleichen Enzyms ist im Rattenileum nach Jejunektomie beschrieben worden (147).

Ein gut untersuchtes Beispiel dafür, daß prinzipiell auch eine Steigerung des Natriumtransportes pro Zelle möglich ist, ist das Caecum der Ratte. Erste Beobachtungen in dieser Richtung wurden an keimfreien Labortieren gemacht. In keimfreiem Milieu gehaltene Tiere besitzen ein stark vergrößertes Caecum (96), aus dem pro Gewebsmasse Natrium und Wasser vermehrt resorbiert werden (82). Gleichzeitig bestehen chronische Durchfälle, die wahrscheinlich durch großmolekulare, aus dem Dünndarm stammende Mucopolysaccharide und Proteine (80) bedingt sind. Diese aus der Schleimsekretion und Epitheldesquamation endogen anfallenden Stoffe werden im Lumen des normalen Caecums bakteriell gespalten und resorbierbar gemacht, während sie im Caecum und Colon keimfreier Tiere ungespalten bleiben, den kolloidosmotischen Druck erhöhen (54) und so die Durchfälle verursachen. Die Mehrresorption von Natrium und Wasser im Caecum stellt möglicherweise eine Adaptation an die chronische Diarrhoe dar, um exzessive Elektrolyt- und Wasserverluste zu vermeiden.

Entsprechend dieser Vorstellung müßten gleichartige Veränderungen auch im Caecum normaler Ratten zu erzeugen sein, wenn man ihrer Nahrung schlecht resorbierbare Stoffe zusetzt. Tatsächlich wurde in den letzten Jahren zunehmend über das Auftreten von Caecumvergrößerungen unter entsprechenden experimentellen Bedingungen berichtet (24,32,53,65,76).

1.2 Modell der diätetischen Adaptation am Caecum der Ratte

In allen diesen Zuständen wurde dem Aspekt der Resorption zunächst wenig Aufmerksamkeit gewidmet. Als Beispiel einer solchen unverdaulichen und großmolekularen Substanz wurde Polyäthylenglykol (PEG) erprobt, das von den Ratten bereitwillig mit dem Trinkwasser aufgenommen wird. Es stellte sich bald heraus, daß dieses Polymer sowohl ein Wachstum des Caecums als auch eine Steigerung des Natriumtransports pro Zelle hervorruft (85). Damit stand ein experimentell leicht zu handhabendes Modell zur weiteren Untersuchung zur Verfügung, wel-

ches gleichzeitig als Prototyp für andere, ähnlich ausgelöste intestinale Adaptationsvorgänge gelten könnte.

Die wichtigsten Ergebnisse, die sich aus den Untersuchungen an PEG-gefütterten Ratten ergaben, sind im folgenden zusammengestellt.

1) Bei der Caecumadaptation kommt es zu einer zellulären Hyperplasie, bei der die Mengen an DNS, RNS und Protein in der Mucosa in konstantem Verhältnis zueinander ansteigen; dabei vergrößern sich Oberfläche, Trocken- und Feuchtgewicht des Gesamtorgans innerhalb von zwei Monaten zunehmend auf schließlich das Zwei- bis Dreifache (84,85,110).

2) Die Nettoresorption von Natrium und Wasser p r o Z e l l e steigt dabei ebenfalls an. In einem vom Wachstum unterschiedlichen Zeitverlauf nimmt sie jedoch binnen zwei Wochen rasch auf das Doppelte, in den übrigen untersuchten sechs Wochen nicht mehr wesentlich zu (84,85,86).

Bezüglich des transmuralen Transports von Kalium, Chlorid und Bicarbonat ergeben sich bei der Adaptation nur geringe Änderungen, welche zudem von der experimentellen Situation abhängig sind (52,81). Ferner zeigt die in vivo gemessene transmurale elektrische Potentialdifferenz einen signifikanten Anstieg bei adaptierten im Vergleich zu nichtadaptierten Tieren (81). Insgesamt sprachen die Transportmessungen dafür, daß es im Verlauf des Adaptationsprozesses zu einer Steigerung der Natriumresorption und zwar speziell deren aktiver Transportkomponente kommt (86).

3) In gleicher Weise wie der Netto-Natriumtransport steigt die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase, deren kausaler Zusammenhang mit dem aktiven Natriumtransport an der basolateralen Zellmembran heute als gesichert gelten kann (61,133,138), in zwei Wochen auf das Doppelte, dann nicht mehr an (86,120,121). Auch dieser Befund war ein Argument für die Steigerung des ak-

tiven Natriumtransportanteils. Die spezifische Aktivität anderer Zellenzyme (Magnesium-ATPase, alkalische Phosphatase, Glucose-6-Phosphatase, Lactatdehydrogenase, Glutamatdehydrogenase) bleibt unverändert (86). Die Aktivitätszunahme der Na-K-ATPase ist nicht durch eine veränderte Enzymkinetik, sondern wahrscheinlich durch einen vermehrten Einbau von Enzymmolekülen in die basolaterale Membran der Zelle verursacht (120,121).

4) Der genaue Mechanismus der Adaptation ist bisher nicht geklärt. Bezüglich hormoneller Ursachen konnte aber eine Beteiligung von Aldosteron oder anderen Nebennieren-Hormonen, sowie von antidiuretischem Hormon und hypophysenvorderlappenabhängigen Hormonen weitgehend ausgeschlossen werden (81,83).

In der Regulation des Elektrolyttransports und der Zellvermehrung scheinen cyclische Nucleotide eine wesentliche Rolle zu spielen. Es lag daher nahe, einer etwaigen Änderung der Konzentration cyclischer Nucleotide an dem beschriebenen intestinalen Adaptationsmodell nachzugehen.

1.3 Cyclische Nucleotide

1958 entdeckte SUTHERLAND das Vorkommen von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP) in lebenden Geweben (107,143). Cyclisches Guanosinmonophosphat (cGMP) wurde erstmals 1963 in Urin und 1969 auch in Zellen nachgewiesen (12,48,62). Beide cyclische Nucleotide kommen in praktisch allen Zellarten vor (vgl. 49,51,101).

Bei diesen cyclischen Nucleotiden handelt es sich um Adenosin- bzw. Guanosinnucleotide, welche an C₃ und C₅ cyclisch mit Phosphat verestert sind. Abbildung 1 zeigt die cyclische Adenosinmonophosphorsäure bzw. Guanosinmonophosphorsäure.

cAMP wird aus ATP unter Abspaltung von Pyrophosphat in der Regel mittels eines membrangebundenen Enzyms, der Adenylatcyclase (101,144) gebildet. Das Adenylatcyclasesystem besteht aus an der Zelloberfläche gelegenen Rezeptoreinheiten, einer im Zellinneren gele-

genen Katalysatoreinheit und einer zwischen diesen Einheiten vermittelnden Transducereinheit (89,101,113).

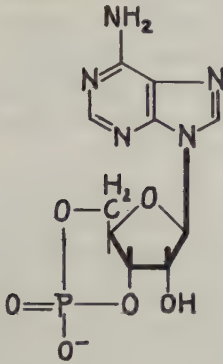


Abb. 1 a) cyclische 3', 5' -
Adenosinmonophosphor-
säure

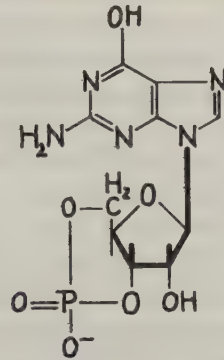


Abb. 1 b) cyclische 3', 5' -
Guanosinmonophos-
phorsäure

Viele Hormone, die nicht in die Zelle eindringen können (101), in zahlreichen Geweben auch betaadrenerge Stoffe (5,101,123) können mit der Rezeptoreinheit reagieren, dadurch die Bildung von cAMP im Zellinneren regulieren und so ihre Befehle in der Zelle über cAMP weiterleiten (second-messenger-Prinzip SUTHERLAND 111,112,142). Die Aktivität des Systems wird aber nicht nur über den Rezeptor durch Hormone oder Neurotransmitter, sondern auch durch andere Faktoren bestimmt. So kann der Transducer z.B. durch GTP und GDP (89,114) beeinflusst werden und auf diese Weise die Aktivität des Katalysators modifizieren (89, 101,114). Die Katalysatoreinheit selbst weist zur Bildung von cAMP eine "Basalaktivität" auf (101), die wiederum aus dem Zellinneren - z.B. durch die Konzentration verschiedener zweiwertiger Ionen wie Ca^{++} - verändert werden kann (31,89).

Die Bildung von cGMP erfolgt aus GTP unter Abspaltung von Pyrophosphat mittels einer Guanylatcyclase (62,126,153). In den meisten bisher untersuchten Geweben wurden mindestens zwei ver-

schiedene Formen der Guanylatcyclase gefunden - eine lösliche und eine membrangebundene (49,70). In Lunge, Leber, Niere und Gehirn befindet sich hauptsächlich die lösliche Form, in Darmepithelien hingegen ist die Guanylatcyclase fast ausschließlich membrangebunden (70). Die höchste Aktivität dieser teilchengebundenen Guanylatcyclase konnte am Bürstensaum lokalisiert werden, ein wesentlich kleinerer Teil an der Basolateralmembran der Darmepithelzellen (25).

Die Guanylatcyclaseaktivität ist weitgehend unabhängig von den Hormonen, welche die Aktivität der Adenylatcyclase regulieren (49,51,62,68). Verschiedene alphaadrenerge und muscarinartige cholinerge Stoffe erhöhen die cGMP-Konzentrationen, meist ohne die cAMP-Spiegel zu beeinflussen (13,118,128). Die Aktivierung der Guanylatcyclase erfolgt dabei wahrscheinlich nicht direkt, sondern indirekt über Einschaltung von Calcium, Sauerstoff und möglicherweise auch Fettsäuren (49).

In den meisten Geweben ist die cAMP-Konzentration 20 bis 100 mal größer als die Konzentration von cGMP (51,68,101). Aus der Beobachtung, daß cAMP und cGMP oft einander entgegengesetzte Effekte haben, schloß GOLDBERG, daß nicht immer die cAMP- oder cGMP-Konzentration, sondern sehr oft das Verhältnis der beiden Konzentrationen zueinander für die Wirkungen von cAMP und cGMP verantwortlich ist (Yin-Yang-Theorie, 50).

Der Abbau von cAMP und cGMP zu 5'-AMP bzw. 5'-GMP erfolgt über Phosphodiesterasen (PDE, 3,49,107). Bisher wurden in allen Geweben, die cyclische Nucleotide produzieren, Phosphodiesterasen gefunden. Es gibt Phosphodiesterasen, welche nur cAMP spalten, solche, die nur cGMP spalten und Phosphodiesterasen, die sowohl cAMP als auch cGMP spalten und deren hydrolytische Aktivität für cAMP durch cGMP (und umgekehrt) beeinflusst wird (2,3,78,145).

Die pharmakologische Hemmung von Phosphodiesterasen, z.B. durch Methylxanthine wie Theophyllin, wird häufig zur experimentellen

Erhöhung der intrazellulären cyclischen Nucleotidspiegel genutzt. Obwohl Theophyllingabe Nebeneffekte wie Calciumefflux, ATP-Verminderung und Einflüsse auf Sauerstoffverbrauch und Proteinsynthese haben kann (3), werden seine Haupteffekte auf die Phosphodiesteraseinhibierung zurückgeführt; Theophyllin ist daher zum meistverwendeten Phosphodiesteraseinhibitor geworden (3).

Die biologischen Wirkungen von cAMP werden wohl ausschließlich, die von cGMP wahrscheinlich ebenfalls über spezifische Proteinkinasen weitervermittelt (49,68,75,98). cAMP-abhängige Proteinkinasen bestehen aus katalytischen (C) und regulatorischen (R) Untereinheiten. Durch Bindung von cAMP an R wird C frei und kann so die vom cyclischen Nucleotid kommenden Informationen weitergeben (60,68,75,109).

Wegen ihrer Eigenschaft, cyclische Nucleotide spezifisch zu binden, verwendet man gereinigte Präparationen von cAMP- oder cGMP-Proteinkinasen häufig in cAMP- bzw. cGMP-Nachweistests.

In den letzten Jahren wurden verschiedene "feedback-Regulatoren", Aktivatoren und Inaktivatoren bzw. "Modulatoren" der Adenylat- und Guanylatcyclasen, Proteinkinasen und Phosphodiesterasen beschrieben (14,49,57,58,59,67,72,74,77), welche stimulierend oder inhibierend auf diese Enzyme einwirken. Deren Aufgaben werden derzeit im Sinne einer Feinregulierung und gegenseitigen Abstimmung der cyclischen Nucleotidspiegel verstanden (14,59,72).

Bivalente Kationen spielen in der Regulierung der cyclischen Nucleotidspiegel eine wichtige Rolle (3,49,51,101). Vor allem dem Calcium wird eine - zum Teil sogar von cAMP und cGMP unabhängige - Rolle als weiterer "second messenger" (108) zugeschrieben. Sehr häufig geht eine cGMP-Erhöhung in der Zelle mit einer gleichzeitigen Calciumerhöhung einher (49,51,108). Bezüglich einer Interpretation dieses Phänomens scheint es in vielen Zellsystemen so, daß vor allem viele "cGMP-Wirkungen" durch das Calcium und nicht das cGMP selbst hervorgerufen wer-

den (27,61,108,124,129). Ob dabei das cGMP im Sinne eines positiven Feedbackregulators die Calcium-Wirkungen unterstützt, ob es als negativer Feedbackregulator die Calcium-Entfernung aus der Zelle beschleunigt und/oder einen weiteren Calcium-Influx in die Zelle hemmt, ist noch nicht vollständig geklärt (8,27,124,127).

In Abbildung 2 sind einige Zusammenhänge zwischen Ca^{++} und den cyclischen Nucleotiden dargestellt. Dort ist u.a. die Möglichkeit einer negativen feedback-Regulation des Ca^{++} -Spiegels durch cGMP berücksichtigt.

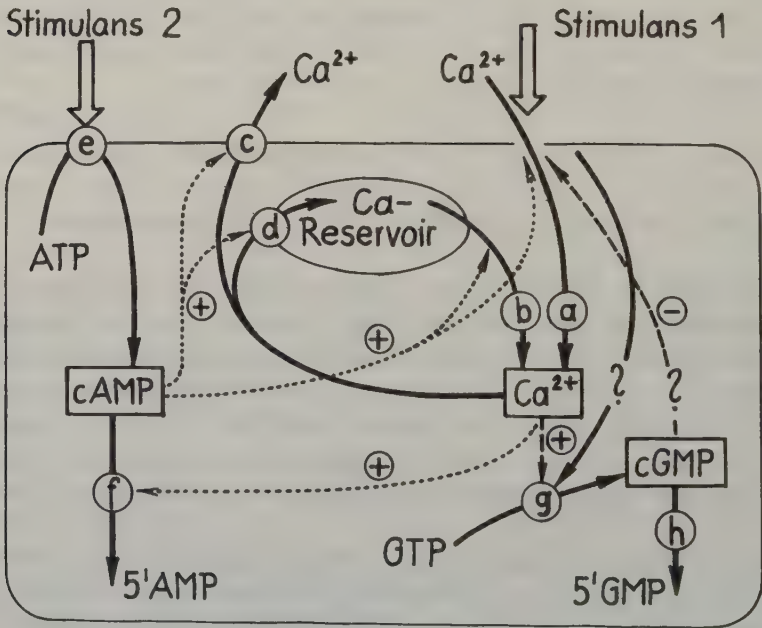


Abb. 2) Übersicht über die wesentlichen für die Regulierung der intrazellulären Spiegel von Ca^{++} , cAMP und cGMP verantwortlichen Prozesse (mod. nach BERRIDGE; 8). Verschiedene Stimulantien (1) erhöhen den Calcium-Influx (a) und/oder bewirken eine Freisetzung von Ca^{++} aus intrazellulären Reservoirs (b) über einen weitgehend unbekannten Mechanismus. Ca^{++} wird aus

dem Cytoplasma entweder in das Ca^{++} -Reservoir (d) oder in das Zelläußere (c) gepumpt. cGMP wird durch Guanylatcyclasen (g) gebildet und über Phosphodiesterasen (h) abgebaut. Die Aktivität der Guanylatcyclasen kann vom Stimulans 1 indirekt über die Einschaltung von Ca^{++} , evtl. auch Sauerstoff und Fettsäuren (49) reguliert werden.

Andere Stimuli 2 erhöhen die cAMP-Spiegel durch Stimulation der Adenylatcyclase (e). Methylxanthine (z.B. Theophyllin) können den Abbau von cAMP (und cGMP) durch Phosphodiesterasen (f) hemmen. Gestrichelte Pfeile weisen auf feedback-Beziehungen hin.

1.4 Cyclische Nucleotide und Wachstum

In benigne und maligne wachsenden Zellkulturen findet man häufig erniedrigte cAMP-Spiegel (8,45,50,119); die cGMP-Spiegel sind dabei oft stark (um das 10- bis 20-fache) erhöht (50, 134). Auch in vivo konnte man in wachsenden Geweben - z.B. in menschlichem Adenocarcinom des Colons (26) - erhöhte cGMP- und erniedrigte cAMP-Spiegel finden. Auch konnte cAMP- oder dB-cAMP-Gabe¹⁾ das Wachstum von malignen Tumoren hemmen (119). Aufgrund solcher Befunde nahm man an, cAMP wirke generell teilungshemmend und cGMP teilungsfördernd (vgl. 119).

Es gibt jedoch viele Tumorarten, bei denen neben erhöhten cGMP-Spiegeln auch erhöhte cAMP-Spiegel gefunden wurden (119,92).

Bei Untersuchungen an synchronisierten Zellkulturen konnte man die cAMP- und cGMP-Spiegel in den einzelnen Phasen des Zellcyclus bestimmen (s. Abb. 3). Die cAMP-Spiegel sind vor allem in der M-Phase erniedrigt; hoch sind sie häufig zu Beginn der G_2 - und am Anfang und Ende der G_1 -Phase (7,45,119,154). Die cGMP-Spiegel hingegen sind stark erhöht, wenn die Zellen aus der G_0 -Phase kommen oder zu einem kurzen Zeitpunkt in der G_1 -Phase (7,134,154). Dies ist jeweils der Zeitpunkt, zu dem eine Zelle für die nächste Teilung determiniert wird.

¹⁾ dB-cAMP (Dibutyryl-cAMP), ein synthetisches cAMP-Derivat, hat - exogen zugesetzt - verstärkte cAMP-Wirkungen. Man nimmt an, daß dies durch erhöhte Membrangängigkeit oder verminderte Spaltbarkeit durch Phosphodiesterasen verursacht ist (119).

Zellteilung

Zelldifferenzierung

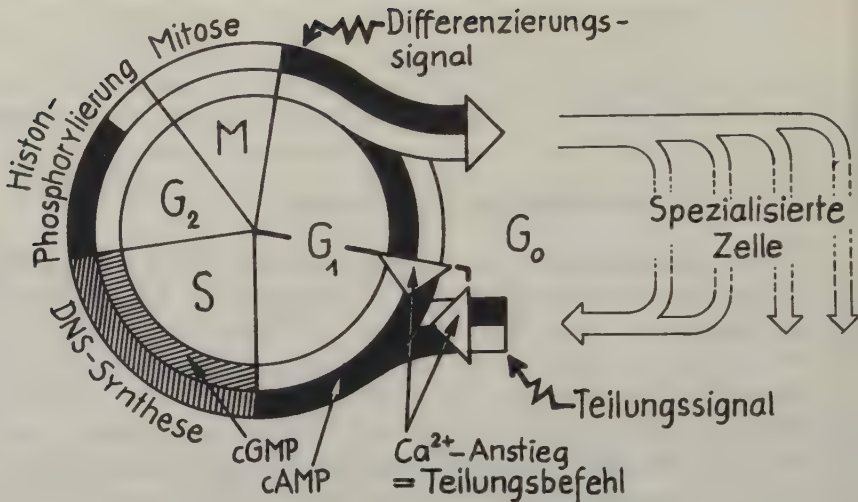


Abb. 3) Häufig in synchronisierten Zellkulturen beobachtete Spiegel von cAMP und cGMP während der verschiedenen Stadien des Zellcyclus (mod. nach BERRIDGE (7), WHITFIELD (154), RYAN et al. (119) und SEIFERT (134)).

äußerer Ring: cAMP-Spiegel;

innerer Ring: cGMP-Spiegel;

□ niedrig, ▨ mittel, ■ hoch;

Der eigentliche Teilungsbefehl erfolgt durch einen Anstieg von Ca⁺⁺.

Es wird aber nicht dem cAMP oder cGMP, sondern dem Calcium die Rolle als auslösender Faktor einer Zellteilung zugeschrieben (7,119,154). Die dabei mit der Calciumerhöhung einhergehende cGMP-Erhöhung wird als Feedback verstanden (7,154).

Aus den Studien des Zellcyclus wird verständlich, daß Veränderungen der cyclischen Nucleotidspiegel in nichtsynchronisierten Ge-

weben Hinweise auf verändertes Wachstumsverhalten geben können, daß aber bei beschleunigtem Wachstum sowohl erhöhte als auch erniedrigte oder unveränderte cyclische Nucleotidspiegel vorkommen können.

In verschiedenen Geweben neugeborener Tiere und regenerativ oder hyperplastisch sich vermehrenden Geweben wurden während des Wachstums Aktivitätsänderungen der löslichen und membran- gebundenen Guanylatcyclasen, cAMP-Proteinkinasen und cGMP-Proteinkinasen (69,73,122) gefunden. Inwieweit diese Enzymaktivitätsänderungen mit der Regulation von Gewebewachstum oder -Differenzierung zu tun haben, ist noch nicht im Einzelnen bekannt.

1.5 Cyclische Nucleotide und Elektrolyttransport

Durchfälle, welche bakteriell durch *Vibrio Cholerae*, verschiedene *E. Coli*-Arten und durch *Shigella dysenteriae* oder hormonell durch Prostaglandine (z.B. beim prostaglandinsezernierenden medullären Schilddrüsenkarzinom) oder VIP (vasoactive intestinal peptide, z.B. beim "pancreatischen Cholerasyndrom") verursacht werden, gehen mit einer Stimulierung der Adenylatcyclase in den Zellen der Darmschleimhaut und damit einer Erhöhung von cAMP einher (17,33,34,36,38,68,131). Auch Sekretin, Glucagon, Gastrin und Pentagastrin, Cholecystokinin, GIP (gastric inhibitory peptide), Vasopressin, Thyrocalcitonin, die Toxine von *Clostridium prefringens* und enteropathogene Viren können wahrscheinlich über eine cAMP-Erhöhung Durchfälle verursachen (21,22,38,39,68,93). Es hat sich die Vorstellung entwickelt, daß intestinale cAMP-Erhöhung zu einer Sekretion von Elektrolyten und Wasser in das Darmlumen führt. Der postulierte Kausalzusammenhang hat sogar dazu geführt, daß man derzeit auf der Suche nach einem spezifischen Adenylatcyclasehemmer des Darms ist in der Hoffnung, sekretorische Durchfallarten durch Erniedrigung des cAMP beseitigen zu können (20,137,155).

Da die Adenylatcyclase im Darm an der Basolateralmembran der

Mucosazellen lokalisiert ist (99), kann sie durch Hormone, welche von der Blutseite wirken, direkt erreicht werden. Die bakterielle Stimulation z.B. durch das Toxin von *Vibrio Cholerae* geschieht von der Luminalseite her. Der Mechanismus, über den hierbei die katalytische Untereinheit der Adenylatcyclase stimuliert wird, ist erst unvollständig geklärt (6, 68,132).

Ein von S.G. SCHULTZ et al. (46,130) vorgeschlagenes Modell für den transmembranalen Natriumtransport im Kaninchenileum ist in Abbildung 4 dargestellt. Danach wird ein Teil des Natriumaustausches an der Luminalseite der Zelle durch cAMP reguliert: cAMP fördert eine aktive Sekretion von Chlorid oder Bicarbonat zusammen mit Natrium und hemmt gleichzeitig die carrier-vermittelte Natrium- und Chloridaufnahme in die Zelle an dieser Oberfläche. Nach diesem Modell ist der aktive Natriumtransportprozeß an der serosalen Seite der Zelle unabhängig vom cAMP-Spiegel. Andere Autoren nehmen gleichfalls als Hauptursache der cAMP-induzierten Sekretion eine carrier-vermittelte, wahrscheinlich aktive Natrium- und Chlorid- und/oder Bicarbonatsekretion an der Luminalseite an (28,38,105). Es hat sich jedoch gezeigt, daß sich die Effekte von cAMP auf den Elektrolyttransport an verschiedenen intestinalen Epithelien und sogar an den gleichen Darmabschnitten verschiedener Spezies nicht immer entsprechen (46). Für das Rattencolon haben BINDER und RAWLINS (9,10) jedoch im Prinzip die gleichen Mechanismen des Elektrolyttransports wie im Kaninchenileum gefunden.

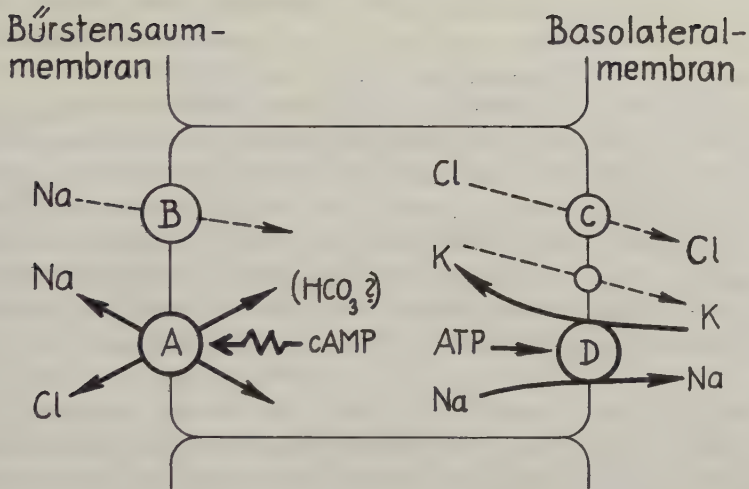


Abb. 4 Modell des transzellulären NaCl-Transports im Kaninchenileum (nach S.G. SCHULTZ et al (46,130)): cAMP fördert die gekoppelte Sekretion von Chlorid und/oder Bicarbonat und Natrium an der luminalen Membran, ohne die aktive Na-Resorption an der serosalen Seite der Zelle zu beeinflussen.

- A = gekoppelter Na-Cl/HCO₃-Transport an der Bürstensaummembran (durch cAMP beeinflussbar)
- B,C = weitere Transportwege für Na bzw. Cl: Mechanismus ungeklärt (Diffusion, Carrier?)
- D = aktiver, ATP-abhängiger Na- und Kaliumtransport an der Basolateralmembran (Na-K-ATPase)

Im Gegensatz zur postulierten Rolle von cAMP im intestinalen Elektrolyttransport ist eine eventuelle Bedeutung von cGMP für diese Transportprozesse noch wenig untersucht. Immerhin hat sich für das Kaninchenileum zeigen lassen, daß Gabe alpha-adrenerger und muscarinartig cholinergischer Substanzen (z.B. Adrenalin, Noradrenalin, Carbachol) dort die Elektrolytresorption steigert (13,38,42). Da diese Substanzen gleichzeitig die cGMP-Spiegel in der Zelle steigern, meist ohne dabei die cAMP-Spiegel zu ändern, könnte cGMP an der Regulation der Natrium- und Flüssigkeitsresorption beteiligt sein (13). Ob und inwieweit dabei speziell der Na-K-ATPase-gekoppelte aktive Natriumtransport an der basolateralen Zellmembran betroffen ist, ist noch nicht untersucht.

Während also eine kausale Rolle des cAMP für die Elektrolytsekretion aus der Darmschleimhautzelle wahrscheinlich ist, könnte cGMP an der Elektrolytresorption beteiligt sein.

1.6 Ziele der vorliegenden Arbeit:

Es sollten eventuelle Korrelationen zwischen cAMP bzw. cGMP und der durch Polyäthylenglykol induzierten Adaptation des Rattencaecums untersucht werden.

Wegen des in 1.2 erwähnten unterschiedlichen Zeitverlaufs zwischen adaptativem Wachstum und adaptativer Steigerung der Natriumresorption (19,85,86) war zu vermuten, daß etwaige Änderungen des cyclischen Nucleotidgehalts zeitlich einem bei der Vorgänge zugeordnet werden konnten. Bei einer zeitlichen Korrelation zum Natriumtransport war nach dem oben diskutierten Modell (46,130) am ehesten eine unveränderte Konzentration von cAMP, nach den später erwähnten Befunden am Kaninchenileum (13,38,42) eine erhöhte Konzentration von cGMP zu erwarten.

Im einzelnen waren folgende Punkte zu bearbeiten:

- 1) Bezüglich der Methodik sollten aus der großen Zahl bisher veröffentlichter Verfahren zur Isolierung und Bestimmung von cAMP und cGMP die für unsere Zwecke geeigneten erprobt und eingeführt werden.
- 2) In einer in vivo-Studie sollten die stationären cAMP- und cGMP-Konzentrationen in Mucosazellen von Normalratten und Ratten in verschiedenen Stadien der Adaptation gemessen werden.
- 3) Die stationären cAMP- und cGMP-Konzentrationen sollten außerdem bei einer in vitro-Studie bestimmt werden. Dabei sollte auch versucht werden, durch Hemmung der Phosphodiesterasen mit Theophyllin Hinweise auf den Nucleotidumsatz während der Adaptation zu bekommen.
- 4) Diese in vitro-Messungen sollten in einer Flußkammer durchgeführt werden. Dabei sollten gleichzeitig der Kurzschlußstrom und die transmurale elektrische Potentialdifferenz vor und nach Theophyllin gemessen werden. Nach den früheren in vivo-Messungen des Na-Transports (19,81,85,86) konnte angenommen werden, daß sich an diesen mit dem Natriumtransport in Beziehung stehenden Parametern Unterschiede zwischen normaler und adaptierender Schleimhaut verifizieren und gegebenenfalls mit dem c-Nucleotidgehalt der Zellen korrelieren ließen.

2. Methodik

Abbildung 5 gibt zunächst eine schematische Übersicht über die methodischen Schritte.

Wie daraus ersichtlich, wurden Kontrolltiere und Tiere in verschiedenen Stadien der Adaptation sowohl in vivo als auch in vitro untersucht.

Bei den in vivo-Versuchen wurde an narkotisierten Tieren das Caecum sofort oder nach einer in vivo-Resorptionsperiode von 2 Stunden excidiert. Anschließend wurde die Mucosa von den tie-

feren submucosalen Gewebsschichten abgeschabt und der Bestimmung von cAMP und cGMP zugeführt.

Bei den in vitro-Versuchen wurde die Schleimhaut excidierter Caeca isoliert und zur Messung elektrischer Potentialdifferenzen und des Kurzschlußstroms in eine Flußkammer eingespannt. Nach Zugabe von Theophyllin wurden die cAMP- und cGMP-Werte gemessen, wobei zusätzliche Parallelbestimmungen an in vitro ohne Theophyllin inkubierter, nicht eingespannter Mucosa erfolgten.

Der erste Schritt der c-Nucleotidbestimmung bestand in der Enzyminaktivierung durch Eiweißfällung unter gleichzeitiger Zugabe einer bekannten Menge von radioaktiv markiertem cAMP und cGMP. Hierauf wurde homogenisiert, zentrifugiert und der c-nucleotidhaltige Überstand zur Trennung von cAMP und cGMP auf Säulen aufgetragen. Das erhaltene Eluat wurde lyophilisiert und in Wasser aufgenommen. Nach Bestimmung der noch vorhandenen Radioaktivität ("Ausbeute") wurde cAMP mittels Proteinbindungstest gemessen, während cGMP radioimmunologisch bestimmt wurde.

Die erhaltenen Werte wurden zur Bestimmung der Konzentrationen im Gewebe auf die jeweiligen Proteinmengen bezogen, wobei die Proteinprobe unmittelbar nach der Markierung entnommen worden war. Im Einzelnen erfolgten die verschiedenen Schritte wie im Folgenden beschrieben.

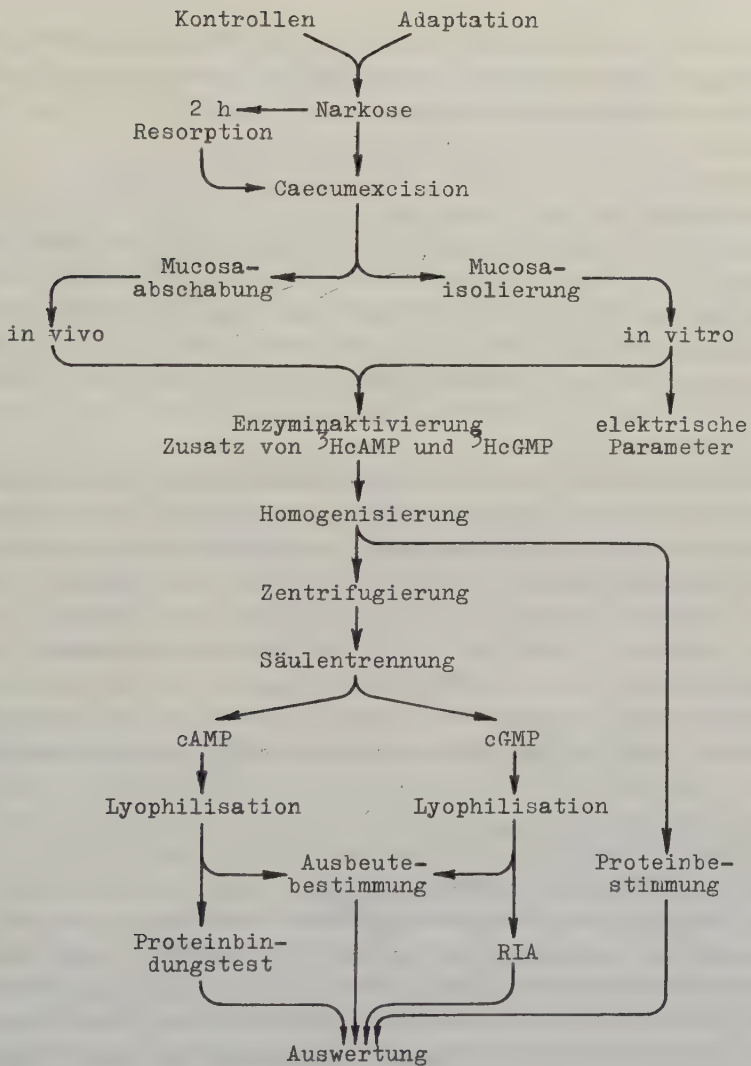


Abb. 5 Schematische Übersicht über die Methodik

2.1 Tierhaltung

Für alle Versuche wurden ausschließlich männliche SPF-Ratten vom Typ WISTAR, Stamm TNO W 70 (Fa. Winkelmann, Kirchborchen) mit einem anfänglichen Körpergewicht von 160 bis 200 g verwendet.

Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere mindestens 8 Tage unter den Bedingungen unseres Tierstalls gehalten. Pro Käfig (Grundfläche 900 cm²) waren 4 - 5 Tiere - zufallsmäßig ausgewählt - untergebracht. Im Tierstall betrug die Temperatur konstant 22° C, die relative Luftfeuchtigkeit 50 - 60 %, und es herrschte ein konstanter Tag-Nacht-Rhythmus von je 12 Stunden.

Die Fütterung der Tiere erfolgte ad libitum mit Standardrattenfutter (Altromin Lage: Haltungsdiät Nr. 1320). Während der ersten 8 Tage erhielten die Tiere zum Trinken Leitungswasser ad libitum, dann wurden sie in zwei Gruppen aufgeteilt. Die Kontrolltiere erhielten weiterhin Leitungswasser, während die experimentellen Tiergruppen mit Polyäthylenglykollösung (Polyäthylenglykol 4000, SERVA, Heidelberg, 160 g/l Wasser) ad libitum getränkt wurden. Zur Bestimmung der cyclischen Nucleotide wurden Tiere aus beiden Gruppen nach 4 bis 56 Tagen verwendet.

2.2 in vivo-Versuche

2.2.1 Entnahme der Mucosa

Die für den jeweiligen Versuchstag vorgesehenen Tiere wurden morgens zwischen 8 und 9 Uhr ins Labor gebracht und eine halbe Stunde später narkotisiert; anschließend wurde die Caecumschleimhaut entweder sofort am narkotisierten Tier entnommen oder aber nach 2 h Resorption von Elektrolyten und Flüssigkeit.

2.2.1.1 Sofortentnahme

Aus einer Lösung, die 80 mg Inactin^R pro ml NaCl phys. enthielt, wurden pro 100 g Rattengewicht 0,1 ml intraperitoneal injiziert. Bis zum Erreichen der Vollnarkose wurden die Ratten für etwa 30 min bei einer mittels Sekundenthermometer kontrollierten Körpertemperatur von 36 - 38° C gelagert. Daraufhin wurde mit einem Längsschnitt das Abdomen geöffnet. Das Caecum wurde excidiert und an der kleinen Krümmung entlang aufgeschnitten. Nach Ausspülen des Inhalts durch eiskalte 0,9 %ige NaCl-Lösung wurde das Caecum auf einem Filterpapier ausgebreitet und die Schleimhaut vorsichtig mit einem stumpfen, eiskalten Skalpell abgeschabt. Die abgeschabten Mucosazellen wurden anschließend wie in 2.4 beschrieben weiterverarbeitet.

Der Zeitraum zwischen Bauchschnitt und Enzyminaktivierung wurde mittels Stoppuhr gemessen und als Entnahmezeit definiert. Diese wurde in vorläufigen Experimenten variiert und später konstant zwischen 30 und 35 sec gehalten.

2.2.1.2 Entnahme nach 2 h Resorption

Narkotisierte Tiere wurden auf Wärmetischen gelagert. Nach Eröffnung des Bauchraums wurde das Caecum vorsichtig aus dem Abdomen luxiert und an den Abgängen von Colon ascendens und Ileum unter sorgfältiger Schonung der im Mesocaecum verlaufenden Gefäße ligiert. Am unteren Pol des Caecums wurde nun ein kleines Loch eingeschnitten. Dann wurde der Inhalt mit einer 0,9 %igen, auf 37° C vorgewärmten NaCl-Lösung ausgewaschen, das Caecum mit 0,9 %iger NaCl-Lösung, 2 - 15 ml je nach Organgröße, gefüllt und die Öffnung verschlossen. Das Caecum wurde in die alte Lage im Abdomen zurückverlegt und das Abdomen mit Michelklammern verschlossen. Diese Bedingungen entsprachen denjenigen früherer Resorptionsuntersuchungen in vivo (83,85,86), wobei in den gegenwärtigen Experimenten die Resorptionszeit von 3 auf 2 h verkürzt und auf eine erneute Messung der schon bekannten Ionen- und Wassernettoflüsse verzichtet wurde. Nach 2 Stunden wurde die Mucosa

wie bei den sofort operierten Tieren abgeschabt und weiterverarbeitet.

2.3. in vitro-Versuche

2.3.1 Flußkammer zur Messung elektrischer Parameter

Zur Messung der elektrischen Potentialdifferenzen und des Kurzschlußstroms wurde eine modifizierte Flußkammer nach USSING (149,150) verwendet. Da die vorhandene Apparatur¹⁾ primär für Kaltblüterhäute konzipiert war, mußte sie für unsere Zwecke bezüglich Sauerstoffzufuhr und Wärmekonstanz modifiziert werden.

Abbildung 6 zeigt ein Schema der Kammer in Anlehnung an eine frühere Beschreibung (149). Die Kammer bestand aus zwei konischen Hälften, zwischen die, auf beiden Seiten durch ein Nylonnetz unterstützt, die isolierte Caecumschleimhaut eingespannt wurde. Beide aufeinanderliegenden Kammerhälften waren mit Parafilm abgedichtet. Die Oberfläche der eingespannten Membran betrug $3,14 \text{ cm}^2$.

Beide Kammerhälften waren über Polyäthylenschläuche verbunden mit je einem kleinen belüftbaren Reservoir. Das Gesamtfüllvolumen betrug 12,5 ml je Hälfte. Die als Badlösung verwendete Ringerlösung wurde in beiden Reservoirs mit auf 37°C vorgewärmtem, wassergesättigtem Carbogen (95 % O_2 , 5 % CO_2) durchperlt, wodurch eine rasche, in einem Vorversuch mittels Farbstoffzugabe überprüfte Durchmischung von Kammern und Reservoirs gewährleistet war. Um Flüssigkeitsverluste durch Verdunstung und Blasenbildung zu vermeiden, wurden auf die Reservoirs Kamme von 20 cm Höhe (20 ml-Pipetten) mit Trichteraufsatz gesetzt. Zum

¹⁾ Ich danke Herrn Prof. Dr. med. J. Eigler, med. Klinik Innenstadt der Universität München für die Überlassung der zu den in vitro-Versuchen benötigten Apparaturen.

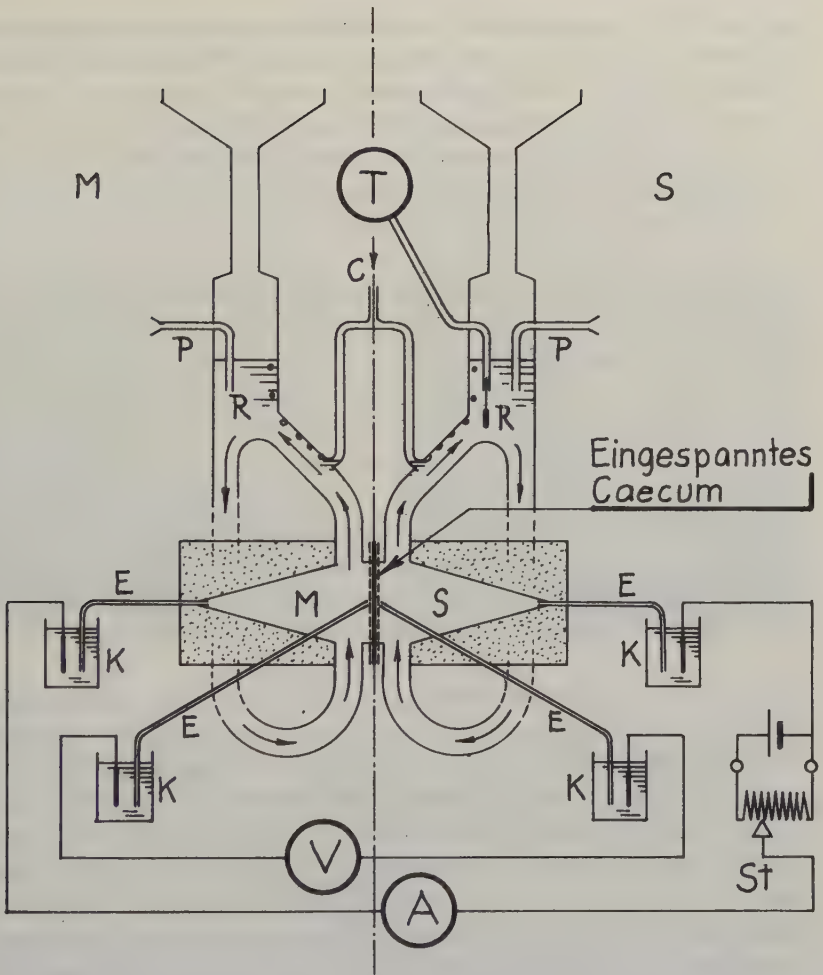


Abb. 6 Versuchsanordnung zur Messung des spontanen elektrischen Membranpotentials (PD) und des Kurzschlußstroms (KSS) an isolierter Caecummucosa von Ratten (Mod. nach Tryzna; 149).

M = Mucosaseite, S = Serosaseite, R = Reservoirs, C = Carbogenzufuhr, P = Sonde zur Probeentnahme, E = Ringer-Agar-Elektroden, K = gesättigte KCl-Lösung, St = Stromquelle für Gleichstrom, T = Temperaturmeßsonde, V = Voltmeter, A = Ampèremeter

Zwecke der Erwärmung und Temperaturkonstanz wurden Kammern und Reservoirs mit einem Schlauchsystem umgeben, welches mit hoher Flußrate kontinuierlich mit vorgeheiztem Wasser durchströmt wurde. Die Temperatur in der Badlösung wurde durch eine Temperatursonde fortlaufend überprüft und bei 37° C gehalten. Probeentnahmen und Zugabe von Theophyllin erfolgten über in die Reservoirs eingebundene Schläuche.

In jeder Kammerhälfte befanden sich zum Einbringen von Elektroden zwei Bohrungen, eine in unmittelbarer Nähe der Membran, eine in 3,8 cm Entfernung davon. In die membran-nahe Öffnung waren Ringer-Agar-Brücken zur Potentialmessung geschoben. Ihre inneren Enden lagen sich auf beiden Seiten der Membran genau gegenüber (Entfernung voneinander 2 mm). Die äußeren Enden dieser Brücken tauchten in eine gesättigte KCl-Lösung, welche über Kalomel-Elektroden mit einem Millivoltmeter in Verbindung standen. Hier konnte mit einer Ablesegenauigkeit von $\pm 0,2$ mV die zwischen beiden Membranseiten herrschende elektrische Potentialdifferenz abgelesen werden.

In die beiden äußeren Bohrungen waren ebenfalls Ringer-Agar-Brücken geschoben, welche über eine gesättigte KCl-Lösung mit Silberelektroden in Verbindung standen. Diesen konnte Gleichstrom zugeführt werden; dieser Strom wurde so gepolt, daß durch seine Spannung das spontane Membranpotential auf Null gebracht wurde. Der dabei fließende Strom wurde mit einem Ampèremeter gemessen und als Kurzschlußstrom (KSS) bezeichnet (Ablesegenauigkeit ± 5 μ A). Der gemessene Strom wurde auf die Oberfläche bezogen und als μ A/cm² ausgedrückt. Der Widerstand wurde nach der Formel $R = \frac{U}{I}$ berechnet und in Ohm x cm² angegeben.

Die Asymmetriepotentiale (max. ± 1 mV) der beiden membran-nahen Brücken wurden vor dem Einspannen der Membran durch Zufuhr von Gleichstrom auf Null gebracht.

2.3.2 Versuchsablauf

Nach Narkotisierung der Tiere wurde das Caecum excidiert, mit

0,9 % NaCl ausgewaschen und über eine sackförmig ausgeblasene Pasteurpipette gestreift (Serosa außen, Mucosa innen). Analog zu der von PARSSONS (100) für das Rattencolon geschilderten Methodik wurde sodann mit einem stumpfen Skalpell die Serosa vorsichtig eingeschnitten, ohne die Mucosa zu verletzen (s. Abb. 7 a).



a)

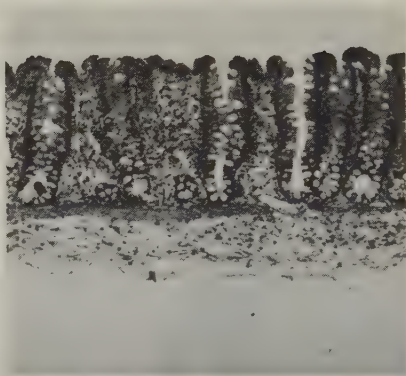
b)

Abb. 7 a, b: Abtrennen der Serosa von der Mucosa eines Rattencaecums

- a: Schnitt durch die Serosa eines umgestülpt auf eine ausgeblasene Pasteurpipette gezogenen Rattencaecums;
- b: vorsichtiges Abziehen der Serosa und Muscularis von der Mucosaschicht.

Die Serosa einschließlich der Muscularis und eines Teils der Submucosa konnte anschließend mit den Fingern abgezogen werden (Abb. 7 b).

Ein histologisches Bild der so isolierten Mucosa zeigt Abbildung 8.



a)

b)

Abb. 8 a, b: Querschnitt durch das Caecum einer Ratte (HE, Vergrößerung 200 x)

a: normal;

b: nach Abziehen der Serosaseite. Es ist deutlich erkennbar, daß Serosa, Muscularis und ein Teil der Submucosa abgezogen sind; die Mucosa ist dabei unverletzt geblieben.

Die Mucosa wurde durch einen Längsschnitt an der kleinen Kurvatur aufgeschnitten und in die Flußkammer eingespannt. Sofort wurden beide Kammerhälften mit je 12,5 ml vorgewärmter isotoner Ringerlösung (Zusammensetzung s. 2.7.2) gefüllt und mit Carbogen durchperlt. Die Zeitspanne vom Eröffnen der Bauchhöhle bis zum Einspannen des Caecums in die Kammer betrug 8 min.

In fünfminütigen Abständen wurden die spontanen elektrischen Potentialdifferenzen (PD) und der Kurzschlußstrom über insgesamt 35 min abgelesen, wobei außer beim Messen des Kurzschlußstroms stets das Membranpotential gemessen wurde.

Nach 35 min wurde aus der die serosale Seite der Präparation begrenzenden Halbkammer 2,5 ml Ringerlösung entnommen und durch

2,5 ml 50 mM Theophyllin enthaltende Ringerlösung ersetzt, so daß die serosale Endkonzentration an Theophyllin 10 mM betrug.

Weitere Registrierung von PD und KSS erfolgte in zweiminütigen Intervallen über insgesamt 8 min, anschließend wurde die Probe der Bestimmung der cyclischen Nucleotide zugeführt (Probe B).

Da bei dieser Anordnung die Konzentration der cyclischen Nucleotide unmittelbar vor Theophyllinzugabe unbekannt war und die geringe Caecumgröße insbesondere bei Kontrolltieren kein Einspannen anderer Schleimhautstücke des gleichen Tieres in weitere Flußkammern zuließ, wurde ein kleineres, für die Kammer nicht benötigtes Schleimhautstück in einem Parallelversuch in jeweils ebenfalls 12,5 ml, mit Carbogen durchperlte und auf 37° C erwärmte Ringerlösung eingegeben. Nach 35-min Inkubation wurde auch in diesem Schleimhautstück die Konzentration der cyclischen Nucleotide gemessen (Probe A).

2.4 Bestimmung von cAMP und cGMP in der Schleimhaut

2.4.1 Trennung von cAMP und cGMP

cAMP und cGMP wurde anfangs mit Hilfe von QAE Sephadex A 25-Säulen getrennt (125). Die erst nach Beginn der Versuche beschriebene Trennung mittels Al_2O_3 und DOWEX 1 x 2-Säulen (63) versprach eine bessere Trennung und geringere Verluste von cAMP und cGMP. Deshalb führten wir bereits im Verlauf der in vivo-Versuche die neue Methodik ein. Für die aus beiden Trennungsarten abgeleiteten Konzentrationen cyclischer Nucleotide ergaben sich beim späteren Vergleich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

2.4.1.1 Trennung mittels QAE Sephadex A 25-Säulen (125)

Enzyminaktivierung, Markierung

Zur Eiweißfällung, Kopräzipitation von ATP, GTP, AMP und GMP (125) und zur Ausbeutebestimmung der cyclischen Nucleotide wurden die Caecumproben (aus 2.2) in ein auf -20° C abgekühltes Homogenisatorglas (Braun, Melsungen 207) gegeben, welches enthielt:

2 ml 50 %igen Alkohol
0,2 ml 1 M Zinkacetat
5000 cpm $^3\text{HcAMP}$ und
5000 cpm $^3\text{HcGMP}$ in je 20 μl H_2O ¹⁾

Die sofort angeschlossene Homogenisation erfolgte durch 8 bis 12 Auf- und Abbewegungen bei 1500 upm im WARING-BLENDOR. Das Homogenat wurde in ein Zentrifugenglas eingegeben, mit 2 ml 50 %igem Alkohol nachgewaschen und gut gemischt.

Für die Proteinbestimmung nach LOWRY wurden nun je 3 x 20 μl des Homogenats entnommen, in Eppendorfgefäße einpipettiert und bei -20°C gelagert.

Die Proben wurden kurzfristig in der Tiefkühltruhe (-20°C) aufbewahrt, bis die restlichen Tiere einer Serie operiert waren. Dann wurde pro Probe 0,1 ml 2 M Na_2CO_3 zur Ausfällung des Zinks als ZnCO_3 zugegeben, gemischt und 30 min. bei 30 000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Niederschlag verworfen. Bis zur Säulentrennung am gleichen Tag wurde der Überstand im Kühlraum gelagert.

Vorbereitung der QAE Sephadex A 25-Säulen (Anionenaustauscher)

Mit diesem Säulenlauf wurden cAMP und cGMP voneinander und von anderen Nucleotiden getrennt.

Eine für mehrere Wochen ausreichende Menge QAE Sephadex A 25 wurde in H_2O gequollen, 24 Stunden stehengelassen und dann in eine Glassäule (5 x 30 cm) auf 5 cm Höhe eingefüllt.

Es wurde behandelt mit:

1) Da ^3Hc -Nucleotide nicht unbegrenzt stabil sind, wurden sie maximal zwei Monate vor dem Gebrauch rechromatisiert.

- 1) 0,2 M HCl, bis der pH 1 - 2 betrug;
- 2) H₂O, bis der pH 4 - 5 betrug;
- 3) 0,2 M NaOH, bis das Eluat Cl-frei war
(geprüft mit AgNO₃, sauer)
- 4) H₂O, bis der pH 8 betrug;
- 5) 0,2 M Ameisensäure, bis der pH 2,5 betrug;
- 6) H₂O, bis der pH 4 betrug.

Schritt 1) und 2) wurden nur zum Regenerieren von bereits gebrauchtem Austauscher durchgeführt, sonst weggelassen. Der Austauscher wurde bis zum Gebrauch verschlossen im Kühlraum aufbewahrt und wiederholt nach seinen Trennungseigenschaften getestet.

Zur Säulentrennung wurde der Austauscher in Bio-Rad-Säulen (0,7 x 10 cm) bis auf eine Höhe von 4 cm eingefüllt und mit 10 ml H₂O nachgewaschen.

Trennung der Nucleotide

Die Probe wurde mit H₂O auf 10 ml verdünnt und dann vorsichtig auf die QAE-Säule aufgetragen.

Es wurde nachgewaschen mit:

10 ml H₂O, dann mit

6 ml 0,1 M Ammoniumformiatlösung pH 9 (eingestellt mit 0,1 M NH₄OH).

Eluiert wurde mit 0,1 M Ammoniumformiatlösung pH 6 (eingestellt mit 0,1 M Ameisensäure).

Das Eluat wurde getrennt aufgefangen:

die ersten 6,5 ml enthielten cAMP, die folgenden

4 ml enthielten beide Nucleotide vermischt,

6,5 weitere ml enthielten cGMP.

Dieses Elutionsprofil (Abb. 9) ergab sich aus Testläufen mit ³HcAMP bzw. ³HcGMP und mit ³HcAMP + ³HcGMP und entsprach dem

der Originalarbeit.

Die vier Milliliter, in denen beide Nucleotide gemischt enthalten waren, wurden verworfen, die cAMP und cGMP gereinigt enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und in Serumflaschen eingegeben.

Dann wurden die Proben eingefroren, lyophilisiert und in 500 μ l 0,1 %igem Rinderserumalbumin (RSA; cAMP-Proben für GILMAN-Bestimmung) bzw. 500 μ l H₂O bid. (cGMP-Proben) aufgelöst.

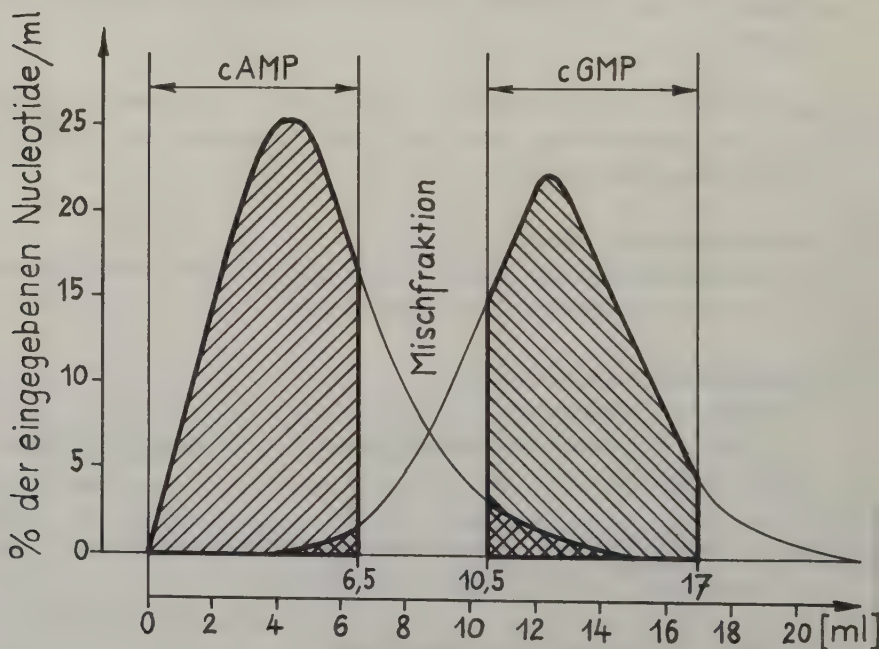


Abb. 9 Trennung von cAMP und cGMP mittels QAE Sephadex A 25-Säulen (125):

cAMP-Fraktion: 0 - 6,5 ml,
Mischfraktion: 6,5-10,5 ml,
cGMP-Fraktion: 10,5-17 ml.
(Einzelheiten s. Text)

2.4.1.2 Trennung mittels Aluminiumoxyd- und DOWEX 1 x 2-Säulen (63)

Enzyminaktivierung, Markierung

Zur Inaktivierung der Enzyme und Recovery-Bestimmung wurden die Gewebeproben (aus 2.2. bzw. 2.3) eingegeben in eine auf 0° C abgekühlte Lösung, welche enthielt:

- 4 ml 1 M Perchlorsäure,
- 5000 cpm $^3\text{HcAMP}$
- 5000 cpm $^3\text{HcGMP}$

Nach sofortiger Homogenisierung wurden Aliquots für die Proteinbestimmung nach LOWRY entnommen und die Proben 30 min zentrifugiert. Der Niederschlag wurde verworfen und die Proben wurden noch am selben Tag zur Trennung auf die Säulen gegeben.

Säulenvorbereitung:

- a) Neutrales Aluminiumoxyd wurde dreimal mit dem 10 -fachen Volumen 1 N Perchlorsäure gewaschen und in fest mit Glaswolle gestopfte Plastiksäulen (6,5 x 40 mm) bis auf 2,2 cm Höhe gefüllt. Dann wurde mit 10 ml 1 M Perchlorsäure gewaschen.
- b) DOWEX 1 x 2 (Anionenaustauscher) wurde durch 0,1 M Ameisensäure äquilibriert. Über gut gestopfter Glaswolle wurde in die Plastiksäulen 2 cm DOWEX aufgetragen. Es wurde mit 10 ml 0,1 M Ameisensäure nachgewaschen.

Durchführung der Säulenläufe:

Die Überstände der Proben wurden auf die Aluminiumsäulen aufgetragen, dann wurde zum Auswaschen der Salze mit 5 ml 1 N Perchlorsäure gewaschen, anschließend mit 10 ml H₂O nachgewaschen, das Eluat verworfen. Nach völligem Durchlaufen wurde zur Elution der cyclischen Nucleotide 4 ml 0,2 M Ammoniumformiat pH 6,0 aufgetragen, das Eluat nun aufgefangen.

Alle 5'-Nucleotide verbleiben dabei in der Säule (63), während cAMP und cGMP ausgewaschen werden (Abb. 10).

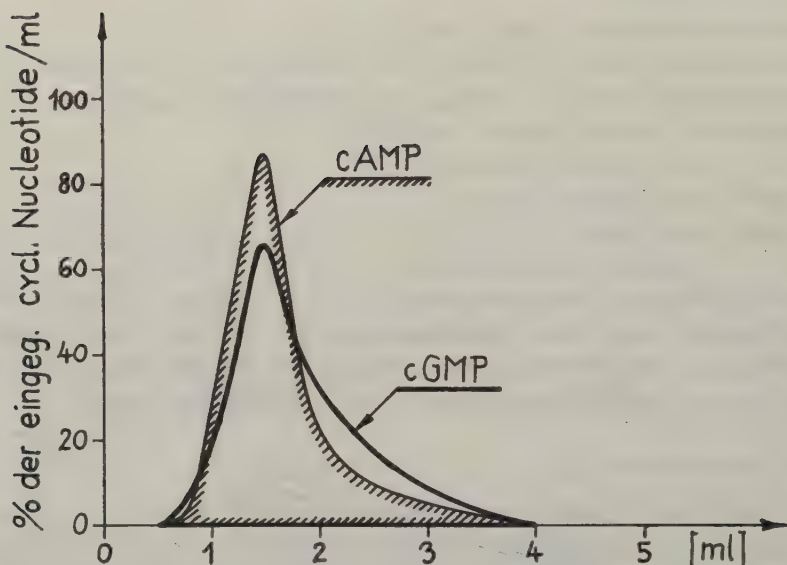


Abb. 10 Trennung cyclischer Nucleotide von anderen Nucleotiden auf der Aluminiumoxydsäule (63): cyclische Nucleotide erscheinen im Eluat, während andere Nucleotide in der Säule bleiben (63).

Das Eluat aus diesem Säulenlauf wurde auf die DOWEX 1 x 2-Säulen aufgetragen und das von c-Nucleotiden freie Spontan-eluat verworfen. Zum Auswaschen von cAMP wurden nun 5 ml 2 N Ameisensäure aufgetragen und alle 5 ml aufgefangen (cAMP-Fraktion). Dann wurden zum Eluieren von cGMP 5 ml 4 N Ameisensäure aufgetragen, der erste halbe ml des Eluats verworfen und die folgenden 4 1/2 ml aufgefangen. (cGMP-Fraktion).

Das Eluatsprofil wurde wie bei der Trennung mittels QAE Sephadex A 25-Säulen ermittelt und ist in Abbildung 11 dargestellt. Da sich eine vollkommene Trennung von cAMP und cGMP nicht durchführen ließ, wurden in Abänderung zur Originalbeschreibung vor dem Auffangen der cGMP-Fraktion 0,5 ml als

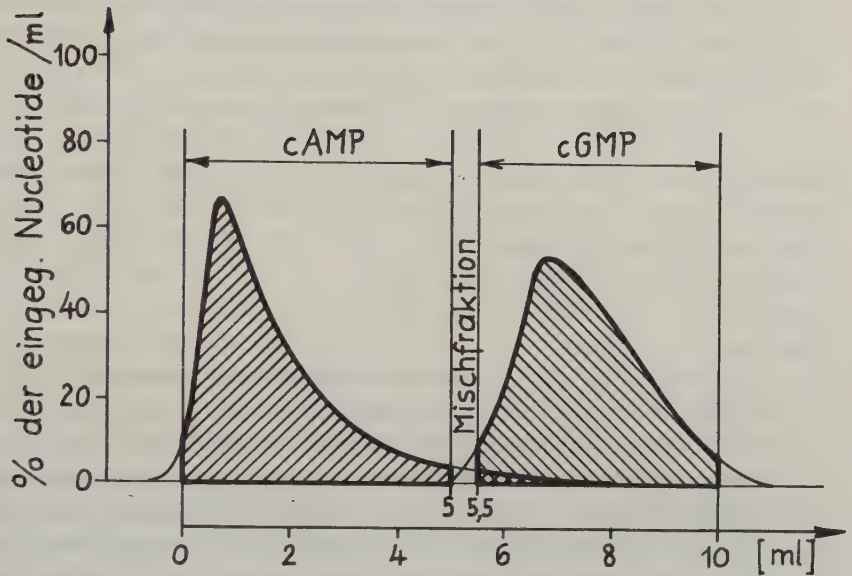


Abb. 11 Trennung von cAMP und cGMP auf der DOWEX 1 x 2-Säule (63):

0 - 5 ml: cAMP-Fraktion
5 - 5,5 ml: Mischfraktion
5,5 - 10 ml: cGMP-Fraktion

(Einzelheiten s. Text)

"Mischfraktion" verworfen, wodurch eine vollkommene Trennung erreicht wurde.

Die cAMP und cGMP enthaltenden Fraktionen wurden nun eingefroren, dann lyophilisiert und anschließend in 500 μ l H_2O aufgelöst.

2.4.2 Ausbeutebestimmung (recovery):

Von den nach der Lyophilisation in 500 μ l 0,1 % Rinderserum-albumin (cAMP-Proben in vivo zur Bestimmung nach GILMAN) bzw. in 500 μ l H₂O (alle anderen Proben) aufgelösten Proben wurden in Duplikaten je 50 μ l in Zählgläschen gegeben und mit 10 ml Toluol-Triton-Zählflüssigkeit (Zusammensetzung s. 2.7.2) im Flüssig-Szintillationszähler 10 Minuten gezählt.

Zur Berechnung der Ausbeute wurden die gezählten Counts pro Minute ("cpm" - Leerwert (L)) mit 10 (50 μ l = 10 % von 500 μ l) und 100 (zur Umrechnung in Prozent) multipliziert und durch die eingegebenen cpm - L geteilt.

Die Ausbeute betrug bei allen Proben, die mit der Trennung mittels QAE Sephadex A 25 getrennt wurden, im Durchschnitt für cAMP 52 %, für cGMP 29 %; mit der Trennung mittels Al₂O₃ und DOWEX 1 x 2-Säulen getrennte Proben hatten für cAMP eine Ausbeute von 71 % und für cGMP eine Ausbeute von 65 %. Wegen der geringen Ausbeute von cGMP bei der ursprünglich angewandten Methode sind für die endgültigen Ergebnisse der cGMP-Bestimmung nur Werte berücksichtigt, die mit der letzteren Trennungsmethode bestimmt worden waren.

2.4.3 Bestimmung von cAMP:

Zur cAMP-Bestimmung wurde eine Methodik verwendet, bei der ³HcAMP und unmarkiertes cAMP um die Bindung an ein Bindungsprotein konkurrieren. Je mehr unmarkiertes cAMP vorhanden ist, desto weniger markiertes cAMP wird gebunden und somit später bei der Bestimmung der Radioaktivität wiedergefunden.

Das für diese Tests benötigte Bindungsprotein wurde im Labor aus Rindermuskel gewonnen.

2.4.3.1 Darstellung des Bindungsproteins (Proteinkinase, Pk):

Verwendet wurde die von TRABER¹⁾ (148) modifizierte Methode von MIYAMOTO et al. (94). Hierbei wird in Rindermuskel vorhandenes Bindungsprotein durch mehrere Fällungen und Läufe über ein Molekularsieb- und eine Ionenaustauschersäule angereichert.

Herstellen der Lösungen:

Sämtliche Lösungen wurden vor der Präparation angesetzt und im Kühlraum (4° C) verschlossen aufbewahrt.

Es wurde angesetzt:

Lösung I	:	5	mM Kaliumphosphatpuffer pH 7	etwa 20 l
"	II	:	0,1 M	" " " 2 l
"	III	:	0,3 M	" " " 2 l
"	IV	:	4 mM EDTA-Lösung	" " " 1 l
(der pH wurde mit etwa 30 ml 1 N NaOH eingestellt, die Stabilität des pH mehrmals nachgeprüft)				
Lösung V	:	1	M Essigsäure	etwa 100 ml
"	VI	:	1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,2; 2 mM EDTA	enthaltend, etwa 100 ml.

Vorbereitung der Säulen:

a) Sephadex G 25, 3 x 45 cm

Sephadex G 25 wurde über Nacht (12 Stunden) bei Zimmertemperatur in Puffer I vorgequollen. Alle weiteren Schritte wurden bei + 4° C durchgeführt:

Der Pufferüberstand wurde am nächsten Tag mehrmals abgesaugt, bis der pH auf 7 eingestellt war; dazwischen wurde jedesmal vorsichtig aufgerührt, so daß die Bruchstücke (fines) an die Oberfläche gelangen und mitabgesaugt werden konnten. Das aufgerührte Sephadex wurde dann vorsichtig in eine Glassäule mit

¹⁾ ich danke Herrn Dr. J. Traber vom MPI für Biochemie Martinsried für die Überlassung seiner Methodik und Anregungen bei der Präparation der Proteinkinase.

einem Durchmesser von 3 cm bis auf eine Höhe von 45 cm eingewaschen. Es wurde mit Puffer I nachgewaschen.

Die Säule wurde über eine Saugpumpe (Durchflußgeschwindigkeit 80 ml/h) und ein Transmissionsmeßgerät (Messung bei 260 nm) an einen Fraktionskollektor angeschlossen. Nun wurde während der Durchführung der Präparation (s.u.) mit Puffer I gewaschen.

b) DEAE-Cellulose DE 52 (2,5 x 30 cm)

DE 52 wurde in Puffer I gelöst und die fines mehrmals abgesaugt. Um bei evtl. Temperaturschwankungen Luftblasen zu vermeiden, wurde sowohl das DE 52 als auch jeder für diesen Austauscher verwendete Puffer (I,II,III) entlüftet.

Nach Einfüllen in die Säule (2,5 x 30 cm) und Anschließen an den Fraktionskollektor wurde etwa 15 Stunden mit Puffer I äquilibriert (Flußgeschwindigkeit 80 ml/h).

Präparation

Aus frischer Schlachtung wurden 500 g noch zuckender Stierschultermuskel (nicht fett, nicht zu sehnig) in Eis ins Labor gebracht.

250 g Muskel wurden in kleine Scheiben geschnitten. Dann wurden 750 ml Lösung IV dazugegeben und homogenisiert (WARING-Blendor). Nun wurde 40 min bei 20 000 g zentrifugiert, der Überstand wurde durch tropfenweise Zugabe von 1 M Essigsäure (Lösung V) auf pH 4,8 gebracht und darauf 10 min stehengelassen.

Es wurde ein zweites Mal 40 min bei 20 000 g zentrifugiert, der Niederschlag verworfen und der Überstand mit Lösung VI auf pH 6,5 eingestellt.

Das Volumen betrug nun 870 ml; es wurden pro 100 ml 32,5 g Ammoniumsulfat langsam eingerührt (hier also 283 g). Dann wurde 30 min gerührt und 20 min bei 16 000 g zentrifugiert.

Der Niederschlag wurde in 50 ml Puffer I aufgenommen, dann wurde vorsichtig gerührt, bis alles gut gelöst war.

Diese Lösung wurde über die Sephadex G 25-Säule entsalzt, mit dem Fraktionskollektor in Fraktionen zu 10 ml gesammelt, und die Protein enthaltenden Proben wurden zusammengefaßt (170 ml, Fraktion 22 bis 40).

Die entsalzte Lösung wurde in die DEAE-Säule gefüllt. Es wurde nachgewaschen mit 300 ml Puffer I, dann mit 500 ml Puffer II und dann mit Puffer III eluiert (Geschwindigkeit 80 ml/h).

Dies ergab drei Elutionsgipfel (Abb. 12); wir testeten alle drei Gipfel auf Bindungsaktivität für cAMP und fanden erwartungsgemäß in Gipfel III hohe Bindungsaktivität.

Die Fraktionen aus Gipfel III (etwa 100 ml) wurden nun wiederum auf eine Sephadex-Säule aufgetragen. Mit Puffer I wurde nachgewaschen, bis die proteinhaltigen Fraktionen eluiert waren.

Die einzelnen proteinhaltigen Proben wurden nun nach ihrer Bindungsaktivität für cAMP getestet. Sie betrug für 10 μ l "Protein-kinase" bei Zugabe von etwa 3 pMol 3 HcAMP bis zu 65 Prozent (s. Abb. 13). Bei Zugabe von 3 HcGMP wurde keine Bindungsaktivität gefunden.

Die Proben mit Bindungsaktivität für cAMP wurden zusammengefaßt (Fraktion 21 - 31: 110 ml). Eine Analyse des Proteingehalts dieser Sammelfraktion ergab 0,5 μ g/ml.

Das Bindungsprotein wurde bei -60° C gelagert. Dabei hat sich die Bindungsaktivität für cAMP binnen zwei Jahren nicht verändert.

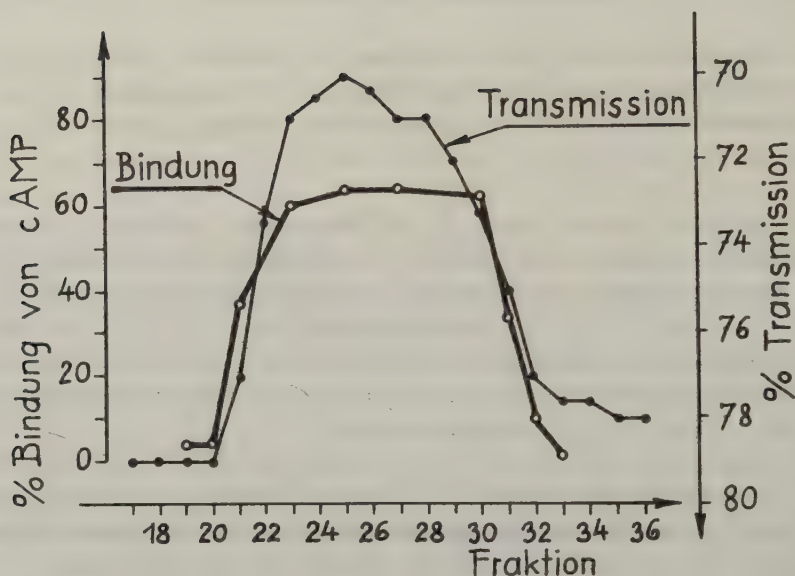


Abb. 13 Darstellung des Bindungsproteins für cAMP nach MIYAMOTO (94) in der Modifikation von TRABER (148):

Vergleich des Elutionsprofils nach dem abschließenden Lauf über die Sephadex G 25-Säule mit der Bindungsaktivität für cAMP.

geschlossene Kreise: Transmission $\hat{=}$ Proteingehalt
 offene Kreise : Bindungsaktivität von je 10 μ l
 Eluat ("Proteinkinase") für 3 pMol 3 HcAMP

2.4.3.2 cAMP-Bestimmung nach GILMAN (47):

Es konkurrieren unmarkiertes und markiertes cAMP um die Bindung am Bindungsprotein. Durch Filtration kann das Bindungsprotein und somit alles damit verbundene cAMP vom nicht gebundenen cAMP getrennt werden und bleibt im Filter. Das Filter kann aufgelöst und die darin enthaltene Radioaktivität bestimmt werden.

Es wurden folgende Lösungen angesetzt:

- 1) $^3\text{HcAMP}$ (pro Probe 10 000 cpm) in 0,1 % Rinderserumalbumin (RSA);
- 2) 0,1 % RSA;
- 3) cAMP; für die Eichkurve wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt, die, gelöst in 0,1 % RSA, pro 20 μl 1 bis 20 pMol cAMP enthielt;
- 4) Kaliumphosphatpuffer 20 mM, pH 6;
- 5) Proteinkinase 10 μl (durch einen Vorversuch war dies als für 10 000 cpm geeignete Menge (30-50 % Bindung) gefunden worden);
- 6) Szintillationsflüssigkeit, bestehend aus 1875 ml Toluol, 625 ml Methylcellulose, 10 g PPO, 0,5 g POPOP; über Nacht gerührt.

Bei 0° C wurde dann nach folgendem Schema in Eppendorfgefäße einpipettiert:

Röhr- chen	$^3\text{HcAMP}$ +NaAc.- Puffer	0,1% RSA	cAMP	Probe	Protein- kinase	
1 - 3	50 μl	160 μl	-	-	-	unspez. Bindung
4 - 6	50 μl	150 μl	-	-	10 μl	Standard- leerwert J_0
7 - 30	50 μl	130 μl	20 μl 1 - 20 pMol	-	10 μl	Eichkurve J_x
31- 33	50 μl	50 μl	-	100 μl	10 μl	Probe 1
usw.						

Vor Zugabe der Proteinkinase wurde gut gemischt, nach der Zugabe nochmal gut gemischt und kurz anzentrifugiert, um evtl. an der Wand sitzende Tröpfchen dem Inkubat zuzuführen.

Die Inkubationszeit betrug 80 Minuten (0° C). Während dieser Zeit wurden in ein Filtrationsgerät Filter (aus Celluloseester, ϕ 25 mm, Porenweite 0,45 μm ; s. 2.7.2) eingelegt und mit Kaliumphosphatpuffer befeuchtet.

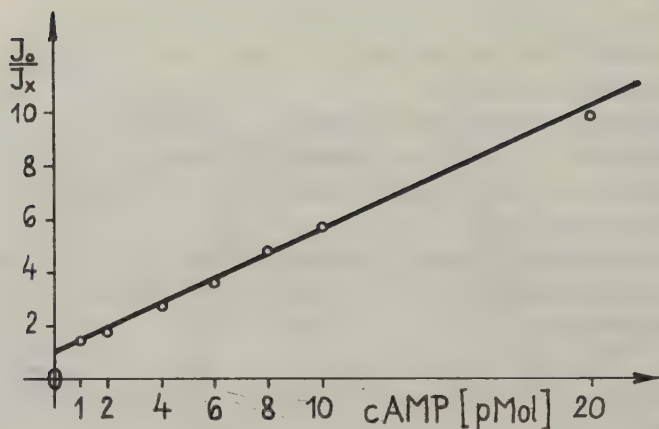


Abb. 14 Eichgerade für die cAMP-Bestimmung nach GILMAN (47). Der Quotient von J_0/J_x (J_0 = Standardleerwert, J_x = Eichwerte) wurde gegen die einzelnen Eichmengen von cAMP aufgetragen. Aus der resultierenden Eichgerade konnten dann die in den Proben enthaltenen Mengen cAMP abgelesen werden.

Dann wurde in die Proben je 1 ml Kaliumphosphatpuffer einpipetiert, gemischt und die Proben auf die Filter gegeben; die Probengefäße wurden mit 1 ml, anschließend die Filter mit 10 ml Kaliumphosphatpuffer nachgewaschen. Das Filtrieren erfolgte mittels eines durch zwei Wasserstrahlpumpen erzeugten Vakuums.

Die Filter wurden nun mit einer Pinzette in Zählgläschen gegeben, dann wurde zu ihrer Auflösung je 1 ml Methylcellusolve einpipettiert. Vor der Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit wurde gut gemischt und dabei nachgeprüft, ob sich alle Filter aufgelöst hatten.

Nach 10 Stunden Aufbewahrung in Dunkelheit wurden die Proben

im Flüssig-Szintillationszähler gezählt (Zählzeit je 10 min).

Zur Auswertung wurde nach Abzug der Zählrate der unspezifischen Bindung der Quotient J_0/J_x aus den Zählraten des Standardleerwerts J_0 und der Eichwerte J_x gegen die jeweils eingegebenen Mengen cAMP aufgetragen. Dies ergab eine Eichgerade, aus der der cAMP-Gehalt der Proben nach Bildung von J_0/J_x abgelesen werden konnte (Abb. 14).

2.4.3.3 cAMP-Bestimmung nach BROSTROM (15)

Die Methodik der cAMP-Bestimmung nach GILMAN brachte für unsere Versuche brauchbare Ergebnisse. Dennoch wurde für die in vitro-Versuche die erst nach Beginn der Arbeiten beschriebene Modifikation nach BROSTROM verwendet, die verschiedene, später zu besprechende Vorteile hat.

Die Methode beruht auf dem gleichen Prinzip wie die Methode nach GILMAN, es wird jedoch die katalytische Untereinheit der Proteinkinase durch Histon gebunden und am Ende wird die mit cAMP reagierende regulatorische Untereinheit statt an das Filter an Hydroxylapatit adsorbiert.

Folgende Lösungen wurden vorbereitet:

- 1) Kälber-Thymus-Histon (Typ II A), 4 mg/ml;
- 2) $^3\text{HcAMP}$ 4000 cpm/10 μl H_2O ;
- 3) cAMP-Eichreihe von 0,078 bis 10 pMol/10 μl H_2O ;
- 4) Natriumacetatpuffer pH 4,5; 50 mM final;
- 5) Proteinkinase (10 μl , 1:6 verdünnt, da dann Bindung 30 - 50 %);
- 6) Hydroxylapatitgel, 1 g auf 8 ml H_2O , dauernd gerührt;
- 7) 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 6,0;
- 8) 3 N HCL.

Bei 0° C wurde nun in Eppendorfgefäße nach folgendem Schema einpipettiert:

Röhr- chen	$^3\text{HcAMP}$	NaAc- Puffer	Histon	H ₂ O bid	cAMP	Probe	Protein- kinase	
1 - 6	10 μl	50 μl	20 μl	10 μl	-	-	10 μl	Stand. Leerw.
7 - 30	10 μl	50 μl	20 μl	-	10 μl 0,078- 10pMol	-	10 μl	Eich- kurve
31 - 36	10 μl	50 μl	20 μl	20 μl	-	-	-	unspe- Bindun
37 - 39	10 μl	50 μl	20 μl	-	-	10 μl	10 μl	Probe
usw.								

Vor Zugabe des Bindungsproteins wurde gut gemischt, nach der Zugabe nochmals gemischt und kurz zentrifugiert. Die Inkubationszeit betrug zwei Stunden.

Dann wurden 100 μl Hydroxylapatitgel-Suspension einpipettiert, gemischt und 1 ml Kaliumphosphatpuffer zugegeben. Nun wurde bei 500 g zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, nochmals 1 ml Kaliumphosphatpuffer zugegeben, zentrifugiert und abgesaugt. Dann wurde zur Auflösung des Hydroxylapatits 100 μl HCl hinzugegeben. Die Proben wurden in Zählgläschen überführt; mit 200 μl H₂O wurde nachgewaschen. Nach Zugabe von 10 ml Toluol-Triton-Zählflüssigkeit (Zusammensetzung s. 2.7.2), Mischen und Stehen für 10 Stunden im Dunkeln wurden die Proben im Zähler gezählt.

Die Auswertung erfolgte mittels spline-approximation durch programmierbaren Rechner. Der Variationskoeffizient betrug im Durchschnitt 12,6. Die ermittelte Eichkurve ist in Abbildung 15 dargestellt. Wurde die Auswertung mittels Bildung von J_0/J_x wie in der Methode nach GILMAN durchgeführt, ergab sich bei gleichen Eichwerten die gleiche Gerade wie bei der Methode nach GILMAN.

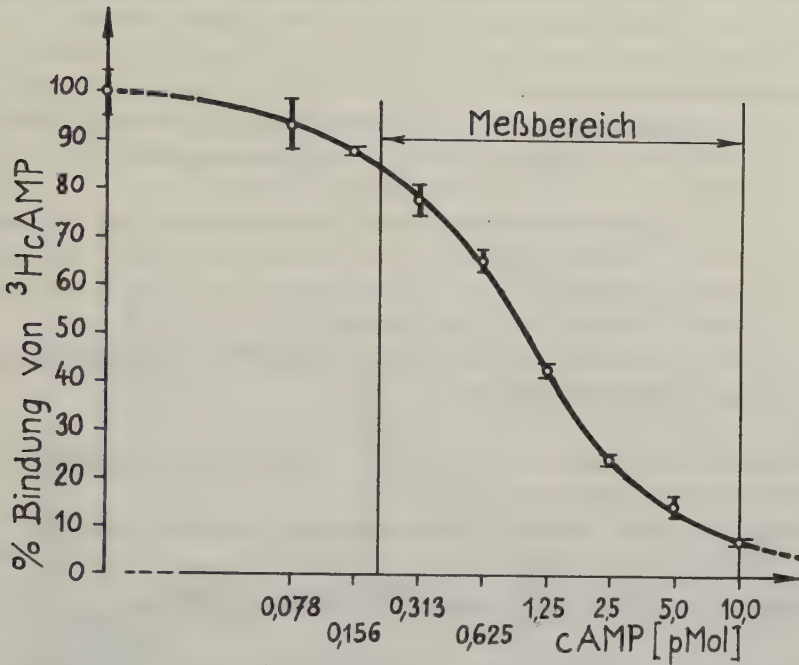


Abb. 15 Eichkurve für die cAMP-Bestimmung nach BROSTROM (15). Die prozentuale Bindung des in den Proben enthaltenen ^3H -markierten cAMP ist semilogarithmisch gegen die in den Eichwerten enthaltenen Mengen cAMP aufgetragen.
(Auswertung durch spline-approximation mittels programmierbarem Rechner).

2.4.4 cGMP-Bestimmung mittels Radioimmunassay (RIA; 140) ¹⁾
Der Test beruht darauf, daß ^{125}J -cGMP und unmarkiertes cGMP an einen cGMP-Antikörper (AK) gebunden werden. Das an den darauf-

¹⁾ Ich danke Herrn Prof. Dr. med. G. SCHULTZ, pharmakologisches Institut der Universität Heidelberg, für die Überlassung von ^{125}J -cGMP und des cGMP-Antikörpers sowie für die Anleitung zur cGMP-Bestimmung.

hin ausgefällten Antikörper gebundene ^{125}J -cGMP kann im Gamma-zähler quantitativ nachgewiesen werden und ist ein umgekehrtes Maß für die Menge unmarkierten - also unbekannten cGMP's.

Es wurden angesetzt:

- 1) 7 mg Gammaglobulin (vom Schwein) pro ml 70 mM (final) Natriumacetatpuffer pH 6,5 als Träger-Protein;
- 2) cGMP, Eichreihe von 10 bis 5000 fMol;
- 3) ^{125}J -Tyrosyl-Methylester des Succinyl-cGMP (im folgenden ^{125}J -cGMP genannt); 5000 cpm/10 μl H_2O als Marker;
- 4) cGMP-Antikörper, 10 μl (Verdünnung so, daß 30 - 50 % des ^{125}J -cGMP gebunden werden);
- 5) 18 % Polyäthylenglykol 6000 (PEG 6000) in 50 mM Natriumacetatpuffer pH 6,5).

Die Reagentien wurden der Reihe nach entsprechend folgendem Schema einpipettiert (bei 0°C):

Röhrchen	^{125}J -cGMP	Gamma-glob.	H_2O bid	cGMP	Probe	Anti-körper	
1 -6	10 μl	50 μl	100 μl	-	-	10 μl	Stand.-leerw.
7 -33	10 μl	50 μl	90 μl	10 μl 10 - 5000 fMol	-	10 μl	Eichkurve
34-39	10 μl	50 μl	110 μl	-	-	-	unspez. Bindung
40-42	10 μl	50 μl	-	-	100 μl	10 μl	Probe 1
usw.							

Vor der Zugabe des Antikörpers wurde gut gemischt und leicht anzentrifugiert.

Das Inkubat wurde über Nacht - mindestens 8 h - im Eisbad stehen gelassen. Am nächsten Tag wurden pro Röhrchen 1000 μl PEG 6000 in Puffer zur Eiweißfällung zugegeben. Nach 5 min wurde gemischt, und dann 10 min bei 1500 g abzentrifugiert (bei 0°C). Der Über-

stand wurde abgesaugt und verworfen, die Röhrchen mit dem Sedi-
ment im Gammaz hler gezählt.

Die Auswertung erfolgte auch hier durch spline-approximation
mittels programmierbarem Rechner, der Variationskoeffizient
betrug im Durchschnitt 19,9. Die ermittelte Eichkurve ist in
Abbildung 16 dargestellt.

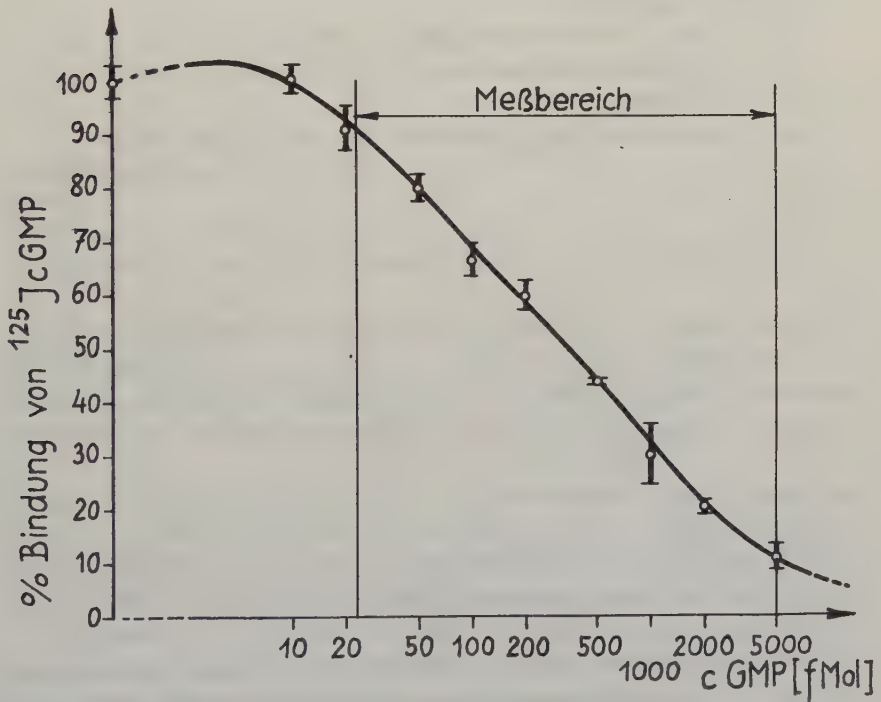


Abb. 16 Eichkurve für die cGMP-Bestimmung mittels Radioimmuno-
assay (140). Die prozentuale Bindung des in den Proben
enthaltenen ^{125}J -markierten cGMP ist semilogarithmisch
gegen die in den Eichwerten enthaltenen Mengen cGMP
aufgetragen.
(Auswertung durch spline-approximation mittels programmier-
barem Rechner).

2.5. Proteinbestimmung nach LOWRY (87) mit dem Reagens von FOLIN-CIOCALTEU (44)

Durch Trichloressigsäure (TCA) werden in einer Probe vorhandene Proteine ausgefällt. Dann wird mit dem wiederaufgelösten Niederschlag die Biuret-Reaktion (Cu^{2+} gibt in alkalischer Lösung mit Proteinen einen blauen Komplex; Tartrat wird zur Verhinderung eines Ausfalls von $\text{Cu}(\text{OH})_2$ zugegeben) durchgeführt, anschließend der entstandene Farbkomplex mit dem FOLIN-Reagens stabilisiert.

Es wurden angesetzt:

- 1) 10 %ige Trichloressigsäure (TCA);
- 2) 10 mg Rinderserumalbumin pro 10 ml H_2O ("RSA");
- 3) 1 N NaOH;
- 4) LOWRY-Reagens, enthaltend: 25 ml 2 %iges Na_2CO_3 ,
0,5 ml 2 %ige Na-K-Tartrat-
lösung,
0,5 ml 1 %ige CuSO_4 -Lösung;
- 5) FOLIN-Reagens: Folin-Lösung, 1 : 2 mit H_2O verdünnt.

Für die Eichkurve wurden in Triplikaten in Eppendorfgefäße 10 - 100 μl RSA einpipettiert. Die Proben waren schon bei der Gewebsentnahme in Eppendorfgefäße eingegeben worden, als Leerstandard wurden 3 x 20 μl H_2O in Eppendorfgefäße eingegeben.

Zu jedem Eppendorfgefäß wurde 1 ml TCA hinzugegeben und gut gemischt. Nach 30 min Stehen in Eis wurde bei 8000 g 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen, TCA-Reste vorsichtig mit Kleenex entfernt. Dann wurde je 100 μl NaOH einpipettiert, 2 min geschüttelt und 10 min bei 37° C inkubiert. Jetzt wurde je Probe 1 ml LOWRY-Reagens hinzugegeben und die Proben 10 min bei Zimmertemperatur stehengelassen. Dann folgte die Zugabe von 100 μl FOLIN-Reagens, worauf sofort gut gemischt wurde. Nun wurde 30 min bei 37° C inkubiert, danach 5 min in Eis abgekühlt. Die Extinktion der Proben am ZEISS-Photometer bei 750 nm gemessen.

Zur Auswertung wurde von der Extinktion der Proben und Eichwerte die Extinktion des Leerstandards abgezogen, dann der Mittelwert aus den Triplikaten gebildet. Die so erhaltenen Werte wurden für die Eichkurve gegen die jeweils darin enthaltenen μg Protein aufgetragen (Abb. 17). Von der Eichkurve konnten anschließend die in den Proben enthaltenen Proteinmengen abgelesen werden.

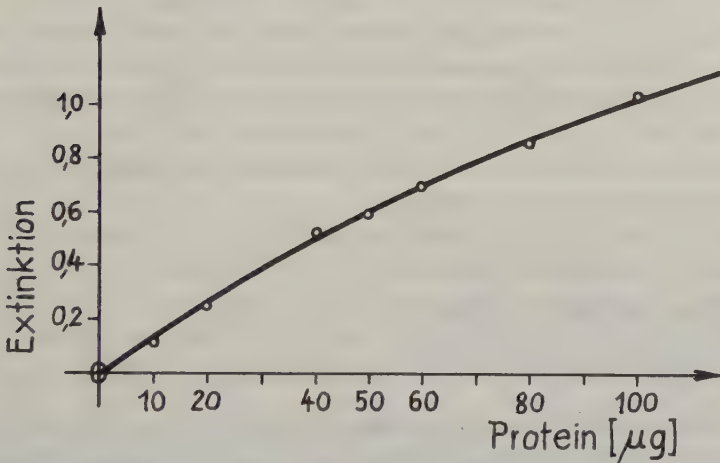


Abb. 17 Eichkurve für die Proteinbestimmung nach LOWRY (87).
E = Extinktion bei 750 nm
Protein = in einer Probe enthaltene Proteinmenge (μg)

Die abgelesenen Proteinmengen mußten mit dem jeweiligen, für die einzelnen Bestimmungsmethoden geltenden Volumenfaktor multipliziert werden, um die im Gesamthomogenat enthaltenen Proteinmengen zu errechnen. Die Art der Gewebeinaktivierung blieb ohne Einfluß auf die bestimmten Proteinmengen, wie in einem Vorversuch getestet wurde.

2.6. Berechnung der Endwerte - Statistische Auswertung

Die bei der cyclischen Nucleotidbestimmung erhaltenen pMol bzw. fMol je Röhrchen wurden auf das Gesamtvolumen von 500 μ l hochgerechnet. Die hier erhaltenen Mengen wurden zur Berücksichtigung der Ausbeute mit 100 %/Ausbeute-% multipliziert. Dies ergab die in jeder Caecumprobe enthaltene cAMP-bzw. cGMP-Menge. Wegen der geringen Mengen cGMP mußte davon zur Berechnung der ursprünglich vorhandenen cGMP-Mengen das zur Ausbeutebestimmung zugesetzte $^3\text{HcGMP}$ abgezogen werden; für cAMP brauchte dies wegen der großen pro Probe vorhandenen cAMP-Mengen nicht gemacht werden. Die berechneten Mengen cAMP bzw. cGMP wurden auf die bestimmten Proteinmengen bezogen, das Endergebnis hatte also die Maßeinheit $\frac{\text{pMol}}{\text{mg}}$ (cAMP/Protein) bzw. $\frac{\text{fMol}}{\text{mg}}$ (cGMP/Protein).

Eine Zusammenfassung der einzelnen Schritte der Berechnung der cAMP-Ergebnisse zeigt die Formel:

$$\begin{array}{c} \text{cAMP} \\ \text{Protein} \end{array} \left(\frac{\text{pMol}}{\text{mg}} \right) = \frac{A}{R \cdot P} \cdot K$$

Diese Formel entsteht unter Zusammenfassung der vor dem Test bekannten, also konstanten Größen, zu K, aus folgender Gleichung:

$$\frac{\text{cAMP}}{\text{Prot}} \left(\frac{\text{pMol}}{\text{mg}} \right) = \frac{A \cdot l}{b} \cdot \frac{r \cdot z}{R \cdot l} \cdot \frac{p}{P \cdot h},$$

wobei

A = cAMP im Bestimmungstest (pMol)

R = gezählte Recovery-counts (cpm)

P = Proteinmenge im Proteinassay (mg)

l = Volumen nach Lyophilisation (μ l)

b = Probenvolumen, das im cAMP-Bestimmungstest eingesetzt ist (μ l)

r = vorgelegte Recovery-counts (cpm)

z = zum Zählen der Recovery eingesetztes Volumen (μ l)

h = Volumen nach Homogenisation (μ l)

p = in Proteinassay eingesetztes Volumen (μ l)

Die hier bekannten Werte sind:

$$K = \frac{l \cdot r \cdot z \cdot p}{b \cdot i \cdot h} \quad (\text{cpm}) = \frac{r \cdot z \cdot p}{b \cdot h} \quad (\text{cpm})$$

=====

Für die Berechnung der cGMP-Werte muß die Gleichung zur Berücksichtigung des zugegebenen $^3\text{HcGMP}$ geändert werden:

$$\frac{\text{cGMP}}{\text{Prot}} \left(\frac{\text{fMol}}{\text{mg}} \right) = \left(\frac{G \cdot r \cdot z}{b \cdot R} - g \right) \cdot \frac{p}{p \cdot h},$$

=====

wobei

G = cGMP im Bestimmungstest (fMol)

g = zur Ausbeutebestimmung zugegebenes $^3\text{HcGMP}$ (fMol)

alle anderen Größen s. oben.

Die Berechnung der statistischen Signifikanzen wurde nach STUDENT unter Verwendung des t-Tests durchgeführt, wobei $2p < 0,05$ bzw. $p < 0,025$ als statistisch signifikant galt. Alle Angaben beziehen sich auf den arithmetischen Mittelwert ($\bar{x}$) $\pm$ den mittleren Fehler des Mittelwerts (SEM).

2.7.1 Verwendete Geräte

Brand-Dispenser- + Dispenserflasche

Eppendorf-Reaktionsgefäße (381000)

Filtrationsapparat (Spezialanfertigung Dr. F. Krug, Leihgabe)

Flüssig-Scintillationszähler (Beckman LS - 330)

Flußkammer = mod. USSINGkammer (Spezialanfertigung Prof. Dr. Eigler, Leihgabe)

Fraktionskollektor (LKB)

Gammazähler (Gammaszint BF 5300, Bertold, Wildbad)

Glaskuvetten

Homogenisator a) Braun Melsungen 853202

b) WARING-Blendor (Cenco 17246-2)

Homogenisatorgläser (Braun, Melsungen 207;608)

Kühltruhe a) - 20°C (Bosch)

b) - 60°C (Bosch)

Lyophilisator (Cenco-Virtis 10 - 100)
MICHEL-Klammern (7,5 mm)
Pasteurpipetten, sackförmig ausgeblasen
pH-Elektrode (Ingold Typ 405)
pH-Meter + Voltmeter (Knick Typ pH 34)
Photometer (ZEISS-Spektralphotometer PMQ 2)
Säulen: BIO-RAD 731-1220 (0,7 x 10 cm, mit Reservoir)
 Glassäule 5 x 30 cm
 " 3 x 45 cm mit Fritte
 " 2,5 x 30 cm " " "
 Plastiksäulen 6,5 x 40 mm (Evergreen Sci. L. A. Nr. 3030-31)
Sekundenthermometer mit Kathetersonde KS (ATMOS Fritzsching)
Serumflaschen (Cenco-Virtis 10-156-10)
Skalpell, stumpf
Waage: Mettler P 1210
 " H 64
Wärmebad (Köttermann Typ 3042)
Wärmebad mit Umwälzpumpe (Paratherm Julabo N 122)
Wärmetisch für Ratten
Zählflaschen für Szintillationszähler (Typ A II, H. Hormuth,
 Heidelberg)
Zentrifuge: Heräus-Christ Typ UJ 2
 MSE high speed 18
 Eppendorffzentrifuge 3200
 MSE Mistral 6 L

2.7.2 Verwendete Reagentien

Agar purum (Behring, Marburg)
Aluminiumoxyd 90 aktiv, neutral (Merck, Darmstadt)
Ammoniumformiat (Roth, Karlsruhe)
cAMP (Boehringer, Mannheim)
³HcAMP (38,4 Ci/m mole; NEN, Boston)
DEAE-Cellulose DE 52 (WHATMAN)
DOWEX 1 x 2 (200 - 400 mesh, HCOO⁻, SERVA, Heidelberg)
EDTA (Titriplex II, Merck, Darmstadt)
Filter (Schleicher & Schüll, Dassel; BA 85, Porengröße 0,45 µm,
Filterdicke 140 µm)

FOLIN-Giocalteus-Phenolreagens "Folin-Lösung", (Merck, Darmstadt)
Gammaglobulin (aus Schweineserum; SERVA, Heidelberg)
cGMP (Boehringer, Mannheim)
cGMP-Antikörper (aus Hasenplasma; Lab. Prof. Dr. G. SCHULTZ,
Heidelberg)

³HcGMP; 21 Ci/mmole (Amersham Buchler)

¹²⁵J-cGMP (Lab. Prof. Dr. G. SCHULTZ, Heidelberg)

Histon (aus Kalbsthymus, Typ II A; Sigma, St. Louis)

Hydroxylapatit (Bio-Gel HTP, Bio-Rad, Calif.)

Inactin^R (Natriumsalz der 5- Äthyl- 5 -(1methyl-propyl)-2-
thio- barbitursäure (Thiobarbital-Natrium)
(Byk Gulden, Konstanz)

Methylcellulose (Äthylenglykolmonomethyläther, Merck, Darmstadt)

Polyäthylenglykol 4000 (Mg. 3000 - 3700, SERVA, Heidelberg)

Polyäthylenglykol 6000 (Mg. 5000 - 7000, Merck, Darmstadt)

PPO (2,5 Diphenyloxazol, Zinsser, Frankfurt/M.)

POPOP (1,4-Bis(-2-(5-phenyl)-oxazolyl)benzol; SERVA, Heidelberg)

QAE SEPHADEX A 25 Anion Exchanger (PHARMACIA, Uppsala)

Ringer-Lösung nach PARSSONS (81), bestehend aus:

NaCl: 113 mM, Na₂HPO₄ : 1,8 mM, NaH₂PO₄ : 0,2 mM,

NaHCO₃ : 25 mM, CaCl₂ : 1,25 mM, MgSO₄ : 1 mM,

KCL : 4,5 mM, Glucose : 12,2 mM

Rinderserumalbumin ("RSA", Behring, Marburg)

SEPHADEX G 25 medium (Pharmacia, Uppsala)

Theophyllin DAB 7 (Univ. Apotheke, München)

Toluol-Triton-Zählflüssigkeit (über Nacht im Dunkeln gerührt):

665 ml Toluol, 335 ml Triton, 50 g PPO, 150 mg POPOP

Triton X 100 (Serva, Heidelberg)

Die hier nicht aufgeführten, allgemein gebräuchlichen Reagentien
erhielten wir aus der Apotheke der Universität München (Rein-
heitsgrad p. A.).

3. Ergebnisse

3.1. in vivo-Versuche

3.1.1 Bestimmung der optimalen Entnahmezeit

Vor der endgültigen Bestimmung der cyclischen Nucleotidspiegel mußte getestet werden, ob in der Zeit, die zwischen dem Eröffnen des Abdomens und dem Eingeben der abgeschabten Mucosa in die Inaktivierungslösung vergeht, sich Änderungen der cyclischen Nucleotidspiegel ergeben.

Geprüft wurden daher die cAMP-Spiegel bei verschiedenen Entnahmezeiten (Abb. 18).

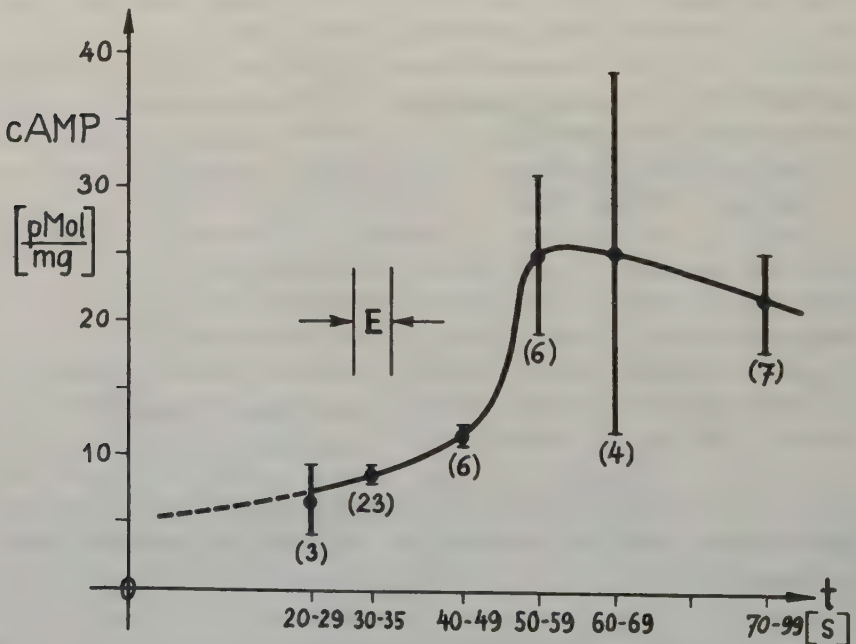


Abb. 18 Abhängigkeit der Konzentration von cAMP in der Caecum-mucosa von der Entnahmezeit. Mittelwerte $\pm$ SEM von je 3 - 23 Kontrollratten pro Gruppe (). E = für spätere Versuche definierte Entnahmezeit.
cAMP-Konzentrationen in pMol/mg Protein.

Es zeigte sich, daß die Konzentration von cAMP bei einer Entnahmezeit bis zu etwa 40 Sekunden keine wesentliche Änderung erfährt. Dann steigt die Konzentration des Nucleotids steil an, um zwischen 50 und 70 Sekunden ein Maximum von etwa dem dreifachen Ausgangswert zu erreichen. Die Konzentrationen nehmen bei noch längerer Entnahmezeit wieder etwas ab, auch ist die Streuung bei den längeren Zeitintervallen größer. Die cAMP-Werte der unter 40 und über 50 Sekunden operierten Tiere sind statistisch signifikant verschieden ($p < 0,001$).

Aus diesen Ergebnissen ergab sich für uns die Folgerung, eine Entnahmezeit von 40 Sekunden nicht zu überschreiten. Daher wurde die Entnahmezeit in allen Experimenten einheitlich bei 30 bis 35 Sekunden gehalten. Bei über 90 % der verwendeten Tiere betrug sie genau 32 Sekunden.

3.1.2 cAMP-Gehalt der normalen und adaptierenden Caecum-schleimhaut

Der cAMP-Gehalt der Mucosa wurde zunächst an Gewebeproben bestimmt, die sofort (d.h. ohne vorheriges Resorptionsexperiment) ex situ entnommen waren. Dabei wurden Kontrolltiere mit Tieren verglichen, die sich nach 4-, 7-, 14-, 28- und 56-tägiger Fütterung von PEG in verschiedenen Stadien der Adaptation befanden. Die Ergebnisse sind in Tabelle I zusammengestellt.

Bei den Kontrolltieren lagen die cAMP-Werte an den einzelnen Versuchstagen zwischen 7,0 und 10,7, bei den PEG-Tieren zwischen 6,0 und 10,5 pMol/mg Protein. Bei beiden Tierkollektiven erwiesen sich die Werte für die länger im Versuch befindlichen - also älteren - Tiere als im Mittel niedriger, doch ließ sich eine statistische Signifikanz z.B. für die 6 Kontrolltiere nach 4 bzw. 7 Tagen gegenüber den 6 Kontrolltieren nach 56 Tagen nicht sichern ($p > 0,05$). Wurden alle Daten für das normale bzw. adaptierende Caecum zusammengefaßt, so ergaben sich Mittelwerte von 8,7 bzw. 7,1 pMol/mg (Tab. I). Dieser Unterschied ist statistisch nicht signifikant ($p > 0,025$).

Tabelle I:
Konzentrationen von cAMP in der Caecumcoca von Kontroll- und PEG-Tieren nach Sofortentnahme des Caecums ex situ:

Tage	Kontrollen			PEG-Tiere		
	n	$\frac{\text{cAMP}}{\text{Prot}}$	$\frac{\text{pMol}}{\text{mg}}$	n	$\frac{\text{cAMP}}{\text{Prot}}$	$\frac{\text{pMol}}{\text{mg}}$
4	3	$9,8 \pm 1,94^a$		4	$9,6 \pm 1,78$	
7	3	$10,7 \pm 2,52$		4	$10,5 \pm 1,19$	
14	5	$10,6 \pm 1,15$		9	$6,0 \pm 0,70^*$	
28	6	$7,0 \pm 0,84$		5	$6,6 \pm 1,54$	
56	6	$7,2 \pm 1,00$		13	$6,2 \pm 0,88$	
alle	23	$8,7 \pm 0,64$		35	$7,1 \pm 0,54$	
						%
						98
						98
						57
						94
						86

^aMittelwerte $\pm$ SEM

* $p < 0,025$ im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe

Eine genauere Auswertung sollte jedoch diejenigen Werte einander gegenüberstellen, die an den gleichen Versuchstagen für die adaptierende und normale Schleimhaut gemessen wurden. Damit sind von der Adaptation unabhängige, z.B. altersabhängige oder auch tagesmethodische Schwankungen ausgeschaltet. In der letzten Spalte von Tabelle I ist daher der für PEG-Tiere gefundene cAMP-Gehalt der Proben in Prozent der jeweiligen Kontrollgruppe angegeben. Bei dieser Analyse zeigte sich, daß sich die Werte der PEG-Tiere nicht von der Kontrollgruppe unterscheiden. Eine Ausnahme bilden die Werte der Tiere nach 14-tägiger Adaptation, welche nur 57 % der am gleichen Versuchstag untersuchten Kontrollen betragen ($p < 0,0025$).

3.1.2.1 Vergleich von Sofortentnahme und Entnahme nach Resorption

Die früheren Messungen des Elektrolyttransports in vivo waren so durchgeführt worden, daß die Resorption einer in die abgebundene Caecumschlinge instillierten 0,9 %igen NaCl-Lösung über mehrere Stunden verfolgt wurde. Da denkbar war, daß diese Versuchsbedingungen die zellulären cAMP-Konzentrationen im Vergleich zur Direktentnahme der Schleimhaut verändern, wurden in einer zweiten Serie auch die cAMP-Konzentrationen nach einer zwei-stündigen Resorptionsperiode überprüft.

Bei 11 Kontrolltieren (4 - 56 Tage), welche zwei Stunden resorbiert hatten, betrug die cAMP-Konzentration $6,5 \pm 0,98$ pMol/mg Protein. Der cAMP-Spiegel von 16 PEG-Tieren (4 - 56 Tage), die zwei Stunden resorbiert hatten, lag bei $7,5 \pm 0,68$ pMol/mg Protein. Es konnte also auch bei diesen Untersuchungen kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen Kontrollen und PEG-Tieren festgestellt werden ($p > 0,20$). Ferner unterschieden sich diese Daten bei beiden Tiergruppen nicht von denen, die bei Direktentnahme gefunden wurden ($8,7 \pm 0,64$ bzw. $7,1 \pm 0,54$ pMol/mg Protein, s. Tab. I, p jeweils $> 0,025$).

Da also die cAMP-Konzentrationen vor und nach der Resorptionsperiode bei beiden Tierkollektiven gleich waren, besteht eine

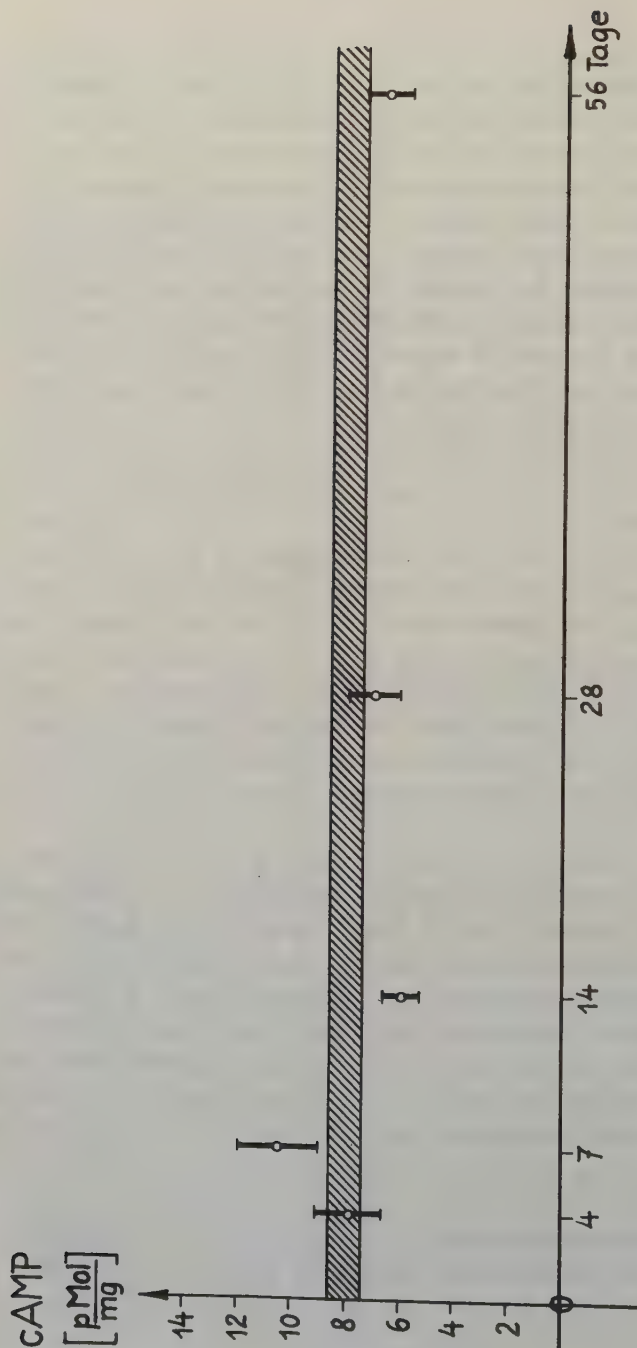


Abb. 19 CAMP-Spiegel (pMol/mg Protein) im Caecum von Kontrolltieren und Tieren mit Caecumadaptation in vivo. Im Unterschied zu Tab. I hier die Werte nach Sofortentnahme und nach der 2-stündigen Resorptionsperiode zusammengefaßt.
 Schraffierter Bereich = SEM der Kontrolltiere ($n = 34$);
 $\bar{x}$ = Mittelwerte $\pm$ SEM für je 6 - 15 Tiere nach 4 - 56-tägiger Fütterung von PEG.

weitere Auswertungsmöglichkeit in einer Zusammenfassung sämtlicher Befunde, die ohne und mit Resorptionsperiode für die normale bzw. adaptierende Schleimhaut gewonnen wurden. Wie Abbildung 19 zeigt, ergibt sich auch bei dieser Auswertung keine Änderung der cAMP-Konzentration in Abhängigkeit von der Adaptation. Auch die Werte nach 14-tägiger Adaptation sind im Vergleich zu diesem Gesamtkontrollkollektiv statistisch nicht signifikant erniedrigt ($p > 0,025$).

Eine Zusammenfassung aller in vivo gewonnenen cAMP-Daten (3.1.1, 3.1.2) ergibt demnach folgendes:

- 1) Die cAMP-Konzentration der normalen Caecumschleimhaut der narkotisierten Ratte beträgt etwa 8 pMol/mg Protein.
- 2) Vergeht zwischen der Eröffnung der Bauchhöhle und der Schleimhautinaktivierung eine Zeit von mehr als 40 sec, so steigt die cAMP-Konzentration auf etwa das Dreifache an.
- 3) Nach einer 2-stündigen Resorptionsperiode von Elektrolyten in vivo findet sich die gleiche cAMP-Konzentration wie bei Sofortentnahme ex situ (unterhalb von 40 sec).
- 4) Während der durch PEG diätetisch induzierten Adaptation ändert sich die stationäre Konzentration von cAMP der Caecumschleimhaut nicht. Lediglich für die Tiergruppe mit 14-tägiger Adaptation wurde eine Erniedrigung gefunden, wenn die Werte mit am gleichen Tag operierten Kontrolltieren verglichen wurden. Bei einem Vergleich mit dem Gesamtkollektiv der Kontrolltiere ergab sich dagegen kein statistisch signifikanter Unterschied.

3.1.3 cGMP im normalen und adaptierenden Caecum

Die cGMP-Spiegel von abgeschabter, sofort inaktivierter Caecum-mucosa sind in Tabelle II und Abbildung 20 dargestellt.

Aus Tabelle II geht hervor, daß die Kontrolltiere in der Caecumschleimhaut cGMP-Spiegel von 450 bis 720, im Mittel von 630 fMol/mg Protein, aufwiesen. Wie im Fall von cAMP nahmen die Werte bei äl-

Tabelle II:
Konzentrationen von cGMP in der Caecum mucosa vor Kontroll- und PEG-Tieren nach
Sofortentnahme des Caecums ex situ:

Tage	Kontrollen			PEG-Tiere		
	n	cGMP Prot	fMol mg	n	cGMP Prot	fMol mg
4	-	-		16	496 ± 41	
7	4	724 ± 108 ^a		7	383 ± 70*	
14	3	711 ± 143		10	318 ± 45*	
28	3	617 ± 258		12	308 ± 25*	
56	3	445 ± 155		7	239 ± 38*	
alle	13	632 ± 79				

^aMittelwerte ± SEM

* p < 0,025 im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe

teren Tieren etwas ab, was allerdings auch hier nicht statistisch signifikant wurde (7 gegenüber 56 Tage, $p > 0,10$). Im Vergleich zu zeitgleich bestimmten Kontrollen zeigten Tiere mit adaptierendem Caecum deutlich erniedrigte cGMP-Werte. Dabei waren bereits nach einer Woche die cGMP-Spiegel auf etwa die Hälfte abgefallen und hielten sich bis zum 56. Tag der Adaptation in diesem Bereich ($p < 0,025$ bis $0,005$).

Abbildung 20 zeigt das Verhalten von cGMP, wenn die Kontrollwerte als Gesamtkollektiv den nach Adaptation erhaltenen Werten gegenübergestellt werden. Hierbei beträgt der p-Wert nach 4 Tagen $0,1 > p > 0,05$, nach 7 Tagen $0,05 > p > 0,025$ und ab 14 Tagen $p < 0,0025$. Damit ist die unter der Adaptation vorhandene Erniedrigung der cGMP-Konzentration nach 4 und 7 Tagen noch nicht, ab der 2. Woche jedoch hochsignifikant.

Prinzipiell die gleichen Ergebnisse (Abfall der cGMP-Werte bei Tieren mit Caecumadaptation innerhalb ein bis zwei Wochen auf die Hälfte, dann nur mehr gering) erhielten wir in den Bestimmungen nach zweistündiger Resorption. Diese cGMP-Daten resultierten jedoch, ebenso wie orientierende Messungen nach Sofortentnahme, aus Versuchen mit Verwendung der QAE Sephadexsäulentrennung (125), welche für cGMP eine durchschnittliche Ausbeute von nur 29 % erbrachte (s. 2.4.2); daher wurden alle mit dieser Trennung gewonnenen cGMP-Daten wegen der schlechten Ausbeute in der Endauswertung nicht berücksichtigt.

Die in vivo-Bestimmung der cGMP-Spiegel (3.1.3) erbrachte also folgende Ergebnisse:

- 1) Die cGMP-Konzentration der normalen Caecumschleimhaut der narkotisierten Ratte beträgt etwa 600 fMol/mg Protein.
- 2) Während der durch PEG diätetisch induzierten Adaptation nimmt die stationäre cGMP-Konzentration der Caecumschleimhaut ab. Sie fällt innerhalb der ersten ein bis zwei Wochen auf die Hälfte und verbleibt im Verlauf des weiteren, insgesamt zweimonatigen Beobachtungszeitraums auf diesem erniedrigten Niveau.

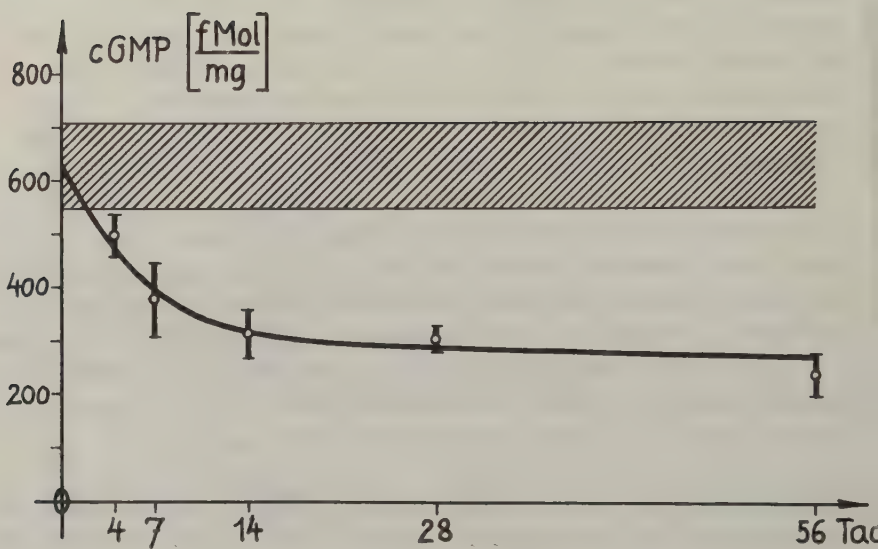


Abb. 20 cGMP-Gehalt (fMol/mg Protein) im Caecum von Kontrolltieren und Tieren mit Caecumadaptation (in vivo)
 Arithmetische Mittelwerte $\pm$ SEM;
 schraffierter Bereich = SEM aller Kontrolltiere (n = 13)
 $\bar{x} \pm$ SEM der Tiere mit Adaptation (n = 7 - 16)

3.2 in vitro-Versuche

In diesen Versuchen sollte eventuellen Änderungen cyclischer Nucleotidkonzentrationen nach Theophyllingabe unter gleichzeitiger Messung elektrischer Parameter an der normalen und adaptierten Caecummucosa nachgegangen werden. Zu diesem Zweck waren einige Vorversuche notwendig.

3.2.1 Vorversuche

Aufgabe dieser Versuche war einmal, den optimalen Zeitpunkt für die Bestimmung der cyclischen Nucleotid-Spiegel nach Zugabe von Theophyllin an der in vitro inkubierten, isolierten Caecummucosa

festzulegen. Als Kriterium diente der Zeitverlauf der elektrischen Parameter (transmurale Potentialdifferenz = PD, Kurzschlußstrom = KSS) nach Theophyllinzugabe. Ferner war die von uns verwendete Flußkammer (s. 2.3.1) ursprünglich für Kaltblütermembranen gebaut, so daß eine auch für das Warmblütercaecum adäquate Wärme- und Sauerstoffzufuhr gesichert sein mußte.

Aus Abbildung 21 geht zunächst hervor, daß der Ersatz von 2,5 ml alter durch frische, theophyllinfreie Ringerlösung im serosalen Kompartiment nur eine unbedeutende, überdies sehr flüchtige Änderung des transmuralen Membranpotentials mit sich brachte. Wurde dagegen die gleiche Menge theophyllinhaltiger Ringerlösung (10 mM) im Austausch zugegeben, dann stieg die PD innerhalb von 2 Minuten deutlich und innerhalb von 5 - 10 Minuten auf ein neues Maximum an, um dann langsam wieder abzufallen. Der KSS verhielt sich zeitlich parallel dazu. Entsprechend diesen Ergebnissen (insgesamt 4 Versuche) wurde als Zeitpunkt für die spätere Bestimmung der Konzentration cyclischer Nucleotide 8 Minuten nach Theophyllinzugabe festgelegt. Abbildung 21 zeigt außerdem, daß die PD nach Abstellen der Carbogenzufuhr innerhalb von 10 - 15 Minuten steil auf Null sank. Gleiches galt für den KSS. Demnach reagierte die Caecumschleimhaut auf Änderungen der Sauerstoffzufuhr sehr empfindlich. Es zeigte sich außerdem, daß die Carbogendurchperlung nur einer Membranseite - wie in der ursprünglichen Kammeranordnung vorgesehen (149) - für das Caecum eine nur unzureichende Sauerstoffversorgung garantierte, wobei PD und KSS bei ausschließlich mucosaler im Vergleich zu nur serosaler Durchperlung rascher absanken. Deshalb belüfteten wir in den nachfolgenden Versuchen die Membranen konstant von beiden Seiten, womit annähernd zeitkonstante elektrische Parameter über 2 Stunden (vgl. Abb. 22) zu erreichen waren. Die erforderliche Temperatur von 37° C konnte durch Umwicklung des Systems mit Heizschlangen konstant aufrechterhalten werden.

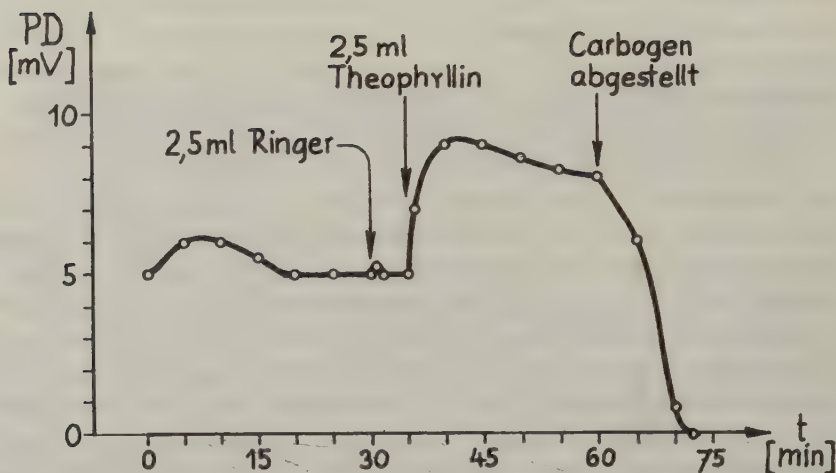


Abb. 21 Transmurale Potentialdifferenz (PD) im Caecum eines PEG-Tieres in vitro:
Einfluß der Zugabe von 2,5 ml Ringerlösung, von 2,5 ml 10 mM Theophyllin-Ringerlösung zur serosalen Seite und des Abstellens der Carbogenzufuhr

3.2.2 Elektrische Parameter vor und nach Theophyllin

Wir untersuchten als erstes das Verhalten der elektrischen Parameter PD, KSS und R (Widerstand) der isolierten Caecumschleimhaut von Kontrolltieren und Tieren mit 14-tägiger Adaptation. Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt.

Das Membranpotential der Tiere mit adaptiertem Caecum betrug anfangs $7,9 \pm 0,7$ mV, stieg dann in 15 min auf $8,7 \pm 0,7$ mV an, um bis zum Ende des Versuchs allmählich auf $6,0 \pm 1,2$ mV abzufallen. Kontrolltiere hatten anfangs eine PD von $2,6 \pm 0,2$ mV; anschließend stieg sie bis $2,8 \pm 0,3$ mV an und nahm dann bis zum Versuchsende auf $1,5 \pm 0,1$ ab. Der statistische Unterschied zwischen beiden Tiergruppen war während der gesamten Versuchsdauer hochsignifikant ($p < 0,0005$).

Der Kurzschlußstrom verlief in beiden Tiergruppen dem Membranpotential etwa parallel. Er stieg am Anfang des Versuchszeitraums bei den PEG-Tieren binnen 15 min von 78 ± 5 auf $87 \pm 4 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ an, um bis zum Abschluß der zweistündigen Versuchsperiode auf $58 \pm 10 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ abzufallen. Bei Kontrollen nahm er von 34 ± 3 auf 36 ± 3 zu und fiel auf $18 \pm 1 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ab (p zwischen Kontrollen und PEG-Tieren $< 0,0005$).

Bei beider Tiergruppen blieb der aus PD und KSS errechnete Membranwiderstand der Caecumschleimhaut während der Beobachtungszeit konstant; er betrug bei den Tieren mit adaptiertem Caecum etwa 100 ± 6 und bei Kontrolltieren etwa $80 \pm 4 \text{ Ohm} \cdot \text{cm}^2$ ($p < 0,025$).

Bei einigen Tieren waren PD und KSS schon am Versuchsbeginn stark abgefallen. Wir nahmen an, daß dies durch fehlerhaftes Einspannen oder eine Beschädigung des Caecums während der Präparation bedingt war. Deshalb sind für die elektrischen Parameter Werte von Caecen mit einem PD-Abfall um mehr als die Hälfte während der ersten 35 min nicht berücksichtigt.

Für die nachfolgenden Versuche mit Theophyllin wählten wir als Zeitpunkt der Theophyllinzugabe 35 min, also einen Zeitpunkt, bei dem bei allen Tieren PD und KSS sich nach den Maximalwerten stabilisiert hatten.

Entsprechend der Ergebnisse der vorgenannten Versuche wurden an der eingespannten Membran für 35 min die elektrischen Eigenschaften gemessen, anschließend 10 mM Theophyllin zur Serosa-seite zugegeben und die elektrischen Eigenschaften für weitere 8 min verfolgt. Dann wurde die Mucosa aus der Kammer entfernt, das Gewebe inaktiviert und die Gewebskonzentration cyclischer Nucleotide gemessen (s. 3.2.2.2).

Für diese Versuche waren neben Kontrolltieren Tiere mit 4- und 14-tägiger Adaptation verwendet worden, da ursprünglich ein Unterschied der elektrischen Parameter bei beginnender und kom-

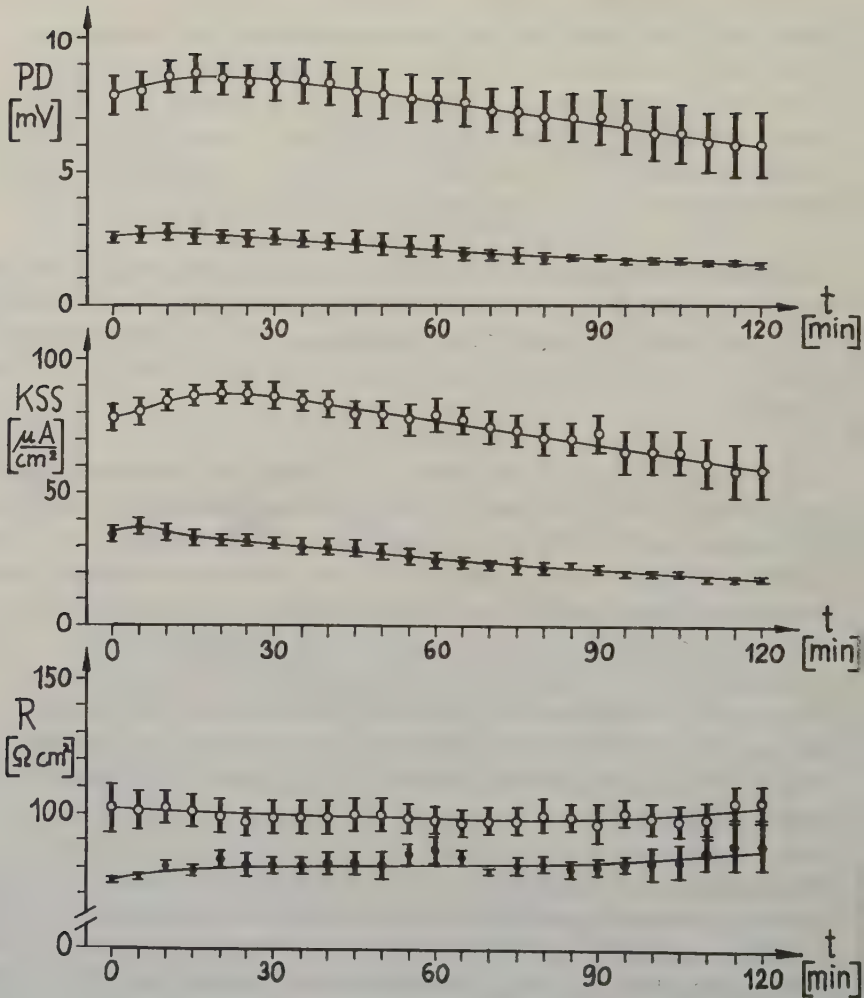


Abb. 22 Transmurale elektrische Potentialdifferenz (PD), Kurzschlußstrom (KSS) und Widerstand (R) der isolierten Caecummucosa von Kontrolltieren (●) und Tieren mit 14-tägiger Caecumadaptation (○) während 2 std. Inkubation in einer modifizierten USSING-Kammer. Mittelwerte von 3 Kontrollen bzw. 7 PEG-Tieren, $\pm$ SEM

pletter Adaptation des Natriumtransports (86) antizipiert worden war. Ein solcher Unterschied ließ sich jedoch statistisch nicht verifizieren, so daß in Abbildung 23 PD, KSS und R der 4- und 14-Tagetiere zusammengefaßt dargestellt sind.

Die elektrische transmurale Potentialdifferenz vor Theophyllinzugabe verhielt sich analog der in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse, ebenso der Kurzschlußstrom und der Widerstand. Obgleich die Absolutwerte der Tiere mit Caecumadaptation in diesem Kollektiv insgesamt etwas niedriger ausfielen, ergab sich für PD und KSS zwischen Kontrollen und Tieren mit Adaptation wiederum ein statistisch signifikanter Unterschied ($p < 0,025$).

Nach Zugabe von Theophyllin zur serosalen Kammerseite stiegen PD und KSS sowohl an der normalen wie an der adaptierten Mucosa stark an. Bei den Kontrollen betrug der PD-Anstieg im Vergleich zum Zeitpunkt unmittelbar vor Theophyllinzugabe $0,8 \pm 0,2$ mV $\pm 67\%$ ¹⁾. Im Vergleich zum absoluten PD-Maximum vor Theophyllin (gewöhnlich nach 10 min) betrug der Anstieg $0,25 \pm 0,18 \pm 20\%$. Bei den PEG-Tieren betrugen die entsprechenden Werte $2,1 \pm 0,3 \pm 62\%$ bzw. $1,1 \pm 0,27 \pm 23\%$. Somit war der Anstieg des Membranpotentials bei den Tieren mit Caecumadaptation numerisch größer als bei den Kontrolltieren, prozentual bei beiden Tiergruppen jedoch gleich.

Das Verhalten des Kurzschlußstroms nach Theophyllin ist ebenfalls in Abbildung 23 dargestellt. Im Vergleich zum Zeitpunkt unmittelbar vor Theophyllinzugabe stieg er bei Kontrolltieren um $13,7 \pm 3,3$ $\mu\text{A}/\text{cm}^2 \pm 100\%$ an, im Vergleich zum vor Theophyllin erreichten KSS-Maximum um $4,5 \pm 3,2 \pm 25\%$ an. Die entsprechenden Werte bei den PEG-Tieren waren $27,6 \pm 3,3 \pm 82\%$ bzw. $15,7 \pm 2,4 \pm 31\%$. Demnach war in beiden Tiergruppen der Zeitverlauf des KSS dem des PD etwa entsprechend; wiederum war in beiden Gruppen der

1) alle hier angegebenen Prozentangaben sind aus den Einzelwerten errechnet und dann gemittelt

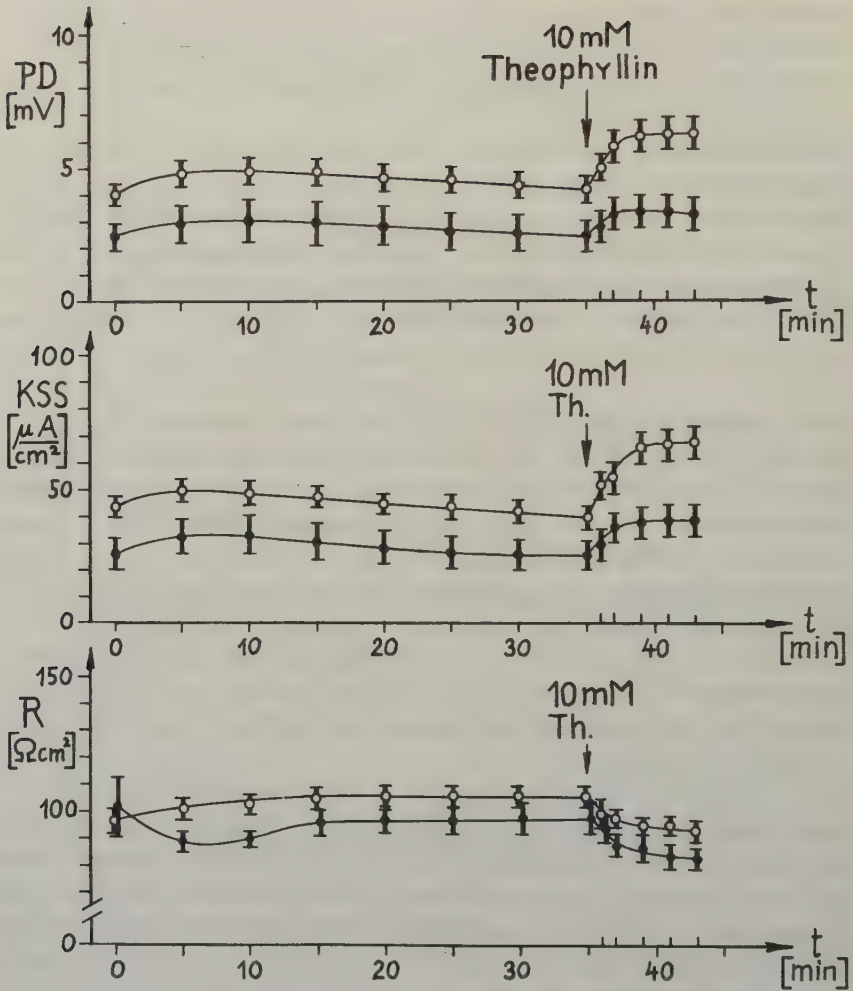


Abb. 23 Einfluß der Zugabe von 10 mM Theophyllin auf die transmurale elektrische Potentialdifferenz (PD), den Kurzschlußstrom (KSS) und den Widerstand (R) der isolierten Caecumucosa von Kontrollratten (●) und Ratten mit 4 - 14-tägiger Caecumadaptation (○) in einer mod. USSING-Kammer:
Mittelwerte von 10 Kontrollen bzw. 20 PEG-Tieren, $\pm$ SEM.

prozentuale Anstieg etwa gleich, während der numerische Anstieg bei den Tieren mit adaptiertem Caecum größer war.

Da der Anstieg des KSS insgesamt den des PD etwas übertraf, sank der errechnete Widerstand R bei beiden Tiergruppen nach Theophyllin um etwa 10 % ab.

Die Ergebnisse der Bestimmung der elektrischen Parameter in normaler und adaptierender Caecumschleimhaut vor und nach Theophyllinzugabe in vitro lassen sich wie folgt zusammenfassen (3.2.1, 3.2.2):

- 1) PD und KSS waren bei Tieren mit Caecumadaptation statistisch signifikant höher als bei Normaltieren.
- 2) PD und KSS stiegen bei Tieren mit Caecumadaptation nach Theophyllinzugabe numerisch stärker an als bei Kontrolltieren. Der prozentuale Anstieg von PD bzw. KSS war dabei bei beiden Tiergruppen jedoch gleich.
- 3) Der aus PD und KSS errechnete Widerstand der Caecumschleimhaut war bei Tieren mit adaptiertem Caecum geringfügig höher als bei Normaltieren. Nach Theophyllin sank er bei beiden Tiergruppen um etwa 10 % ab.

3.2.3 Cyclische Nucleotide vor und nach Theophyllin

Die Konzentrationen cyclischer Nucleotide wurden 8 Minuten nach Theophyllinzugabe (10 mM) gemessen (Probe B), nachdem die elektrischen Parameter zuvor in der Flußkammer verfolgt worden waren (1.3.2.2). Parallel dazu wurden die cAMP- und cGMP-Konzentrationen von Schleimhautstückchen gemessen, die dem gleichen Caecum entnommen und in theophyllinfreier Ringerlösung 35 min inkubiert worden waren (Probe A, Basiswert). Tiergruppen waren wie oben Kontrollratten sowie Ratten nach 4-tägiger und 14-tägiger Adaptation.

3.2.3.1 cAMP

Die Ergebnisse der cAMP-Bestimmung in vitro vor und nach Theophyllinzugabe sind in Abbildung 24 dargestellt.

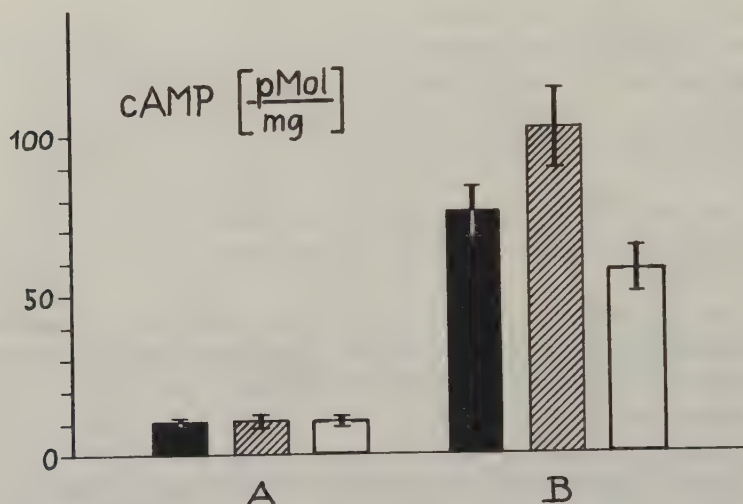


Abb. 24 Einfluß von Theophyllin (10 mM serosal) auf die cAMP-Spiegel der isolierten Caecummucosa von Normalratten und von Ratten mit Caecumadaptation. cAMP-Konzentrationen in pMol/mg Protein. A = Probe A (Basiswert); B = Probe B (8 min nach Theophyllin). Dunkle Flächen = Kontrolltiere (n = 14); schraffierte Flächen = 4 Tage Adaptation (n = 8); weiße Flächen = 14 Tage Adaptation (n = 19); Mittelwerte $\pm$ SEM.

Vor Theophyllinzugabe waren die cAMP-Spiegel in allen drei Versuchsgruppen gleich. Kontrollen hatten einen Wert von $10,3 \pm 0,96$, 4 Tage PEG-gefütterte Tiere von $10,5 \pm 1,92$ und 14-Tage-Tiere von $10,4 \pm 1,22$ pMol cAMP/mg Protein. Diese Werte liegen geringfügig höher als die bei Kontroll- und PEG-Tieren in vivo gefundenen Konzentrationen (vgl. 3.1.2).

8 min nach Theophyllin betrug die cAMP-Konzentration bei Kontrolltieren $75,1 \pm 8,0$ pMol/mg Protein. Im Vergleich dazu lagen die cAMP-Konzentrationen bei Tieren mit 4-tägiger Adaptation bei $100,5 \pm 12,5$ und bei Tieren mit 14-tägiger Adaptation bei $56,7 \pm 6,9$ pMol/mg Protein. Beide Werte sind vom Kontrollkollektiv nicht ($p > 0,025$), untereinander jedoch statistisch signifikant verschieden ($p < 0,0025$).

Tabelle III prozentualer Anstieg des cAMP-Spiegels in isolierter Caecumschleimhaut von Ratten nach Theophyllinzugabe.

Tage der Adaptation	vor Theophyllin	8 min Theophyllin
	%	%
0 (Kontrollen)	100	781 ^a
4	100	1048
14	100	584

^aaus Einzelwerten errechnet und dann gemittelt.

Tabelle III zeigt den Anstieg von cAMP in den verschiedenen Tiergruppen bei prozentualer Auswertung. 8 Minuten nach Theophyllinzugabe betrug der cAMP-Spiegel bei Kontrolltieren das 8-fache, bei Tieren mit 4-tägiger Adaptation das 10-fache und bei Tieren mit 14-tägiger Adaptation das 6-fache des Basiswertes.

3.2.3.2 cGMP

Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der cGMP-Bestimmung in vitro vor und nach Theophyllinzugabe.

Vor Theophyllinzugabe betrugen die cGMP-Spiegel von Kontrollen 293 ± 37 fMol/mg Protein, von Tieren mit 4-tägiger Caecumadaptation 189 ± 32 fMol/mg und von Tieren mit 14-tägiger Adaptation 278 ± 28 fMol/mg Protein. Im Vergleich zu den in vivo-Daten

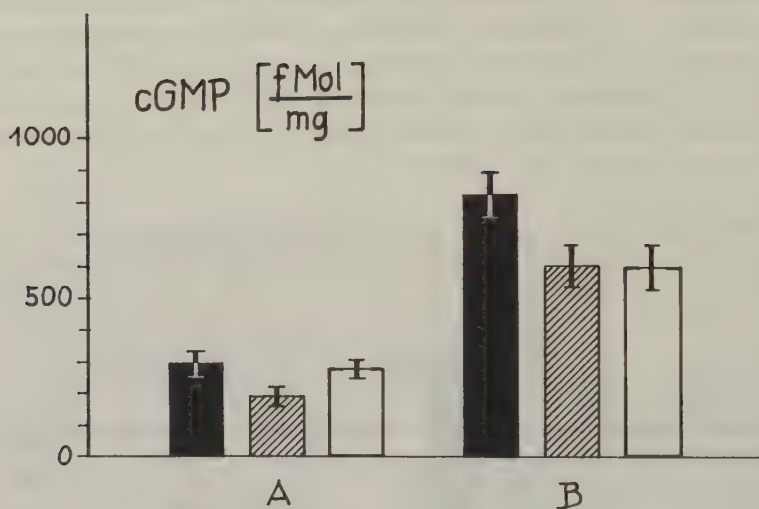


Abb. 25 Einfluß von Theophyllin (10 mM serosal) auf die cGMP-Spiegel in der isolierten Caecummucosa von Normalratten und Ratten mit Caecumadaptation; cGMP-Konzentrationen in fMol/mg Protein; A = Probe A (Basiswert), B = Probe B (8 min Theophyllin); dunkle Flächen = Kontrolltiere (n = 14), schraffierte Flächen = 4 Tage Adaptation (n = 7), weiße Flächen = 14 Tage Adaptation (n = 18); Mittelwerte $\bar{x} \pm$ SEM

lagen die in vitro-Werte somit bei den Kontrolltieren etwa halb so hoch (vgl. 3.1.3). Die Werte der Tiere mit Caecumadaptation lagen insgesamt etwas niedriger als die der Kontrollen, eine statistische Signifikanz ($0,05 > p > 0,025$ nach 4 Tagen) ließ sich jedoch nicht sichern.

Acht Minuten nach Theophyllinzugabe war bei Kontrollen der cGMP-Spiegel auf 814 ± 69 , bei 4-Tage-Tieren auf 598 ± 67 und bei 14-Tage-Tieren auf 588 ± 72 fMol/mg Protein angestiegen. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Kontrollen und PEG-Tieren ergaben sich dabei nach 4-tägiger Adaptation noch nicht

($0,05 > p > 0,025$), wohl aber nach 14 Tagen ($p < 0,025$).

Tabelle IV zeigt den theophyllinbedingten Anstieg von cGMP bei den einzelnen Tiergruppen bei prozentualer Auswertung. Dieser Anstieg betrug bei den Kontrolltieren 370 %. Mit 356 % war er bei den Tieren mit 4-tägiger Adaptation etwas niedriger, nach 14-tägiger Adaptation hingegen mit nur 221 % deutlich erniedrigt.

Tabelle IV prozentualer Anstieg des cGMP-Spiegels in isolierter Caecumschleimhaut von Ratten nach Theophyllinzugabe.

Tage der Adaptation	vor Theophyllin	8 min nach Theophyllin
	%	%
0 (Kontrollen)	100	370 ^a
4	100	356
14	100	221

^a Prozentangaben aus Einzelwerten errechnet und dann gemittelt.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse der in vitro-Bestimmung von cAMP und cGMP in der isolierten Caecummucosa ergibt also folgendes:

1) Die cAMP-Konzentrationen in vitro betrugen bei Kontrolltieren und Tieren mit Caecumadaptation vor Theophyllin etwa 10 pMol/mg Protein und unterschieden sich nicht voneinander. Im Vergleich zu den in vivo gemessenen Konzentrationen waren die in vitro-Konzentrationen nur geringfügig höher.

2) 8 Minuten nach Theophyllin stiegen die cAMP-Spiegel in vitro bei Kontrolltieren auf das 8-fache, bei Tieren mit 4-tägiger Adaptation auf das 10-fache und bei Tieren mit 14-tägiger Ad-

aptation auf das 6-fache des jeweiligen Basiswertes an.

3) Die cGMP-Konzentrationen betrugen bei Kontrolltieren in vitro etwa 300 fMol/mg Protein und lagen damit deutlich niedriger als in vivo (600 fMol/mg Protein). Im adaptierten Caecum waren die cGMP-Spiegel in vitro gegenüber den Kontrollen geringfügig, aber statistisch nicht signifikant, vermindert.

4) 8 Minuten nach Theophyllinzugabe stiegen die cGMP-Konzentrationen bei Kontrollen und Tieren mit 4-tägiger Adaptation auf das 3,7 bzw. 3,6-fache, bei Tieren mit 14-tägiger Adaptation nur auf das 2,2-fache des Basiswerts an.

4. Diskussion

4.1 Zur Methodik

4.1.1 Gewebeentnahme

In unseren Versuchen wurden die Ratten mit Inactin^R (einem Thiobarbiturat) narkotisiert, die Gewebeentnahme erfolgte dann am narkotisierten Tier. Häufig angewandte Alternativmethoden bei der Bestimmung von cyclischen Nucleotiden sind Decapitierung oder Eintauchen des Versuchstiers in flüssigen Stickstoff. Für unsere Versuche wurde die Narkotisierung gewählt, da bei früheren Untersuchungen des Elektrolyttransports und der Na-K-ATPase (81,110,120) ebenfalls Inactin^R verwendet worden war, so daß jetzt vergleichbare experimentelle Bedingungen vorlagen. Außerdem bringt die Decapitierung einen unerwünschten Zeitverlust (s.u.) mit sich, und nach Eintauchen in flüssigen Stickstoff sind eine Reinigung des Caecums und die Abschabung der Mucosa schwer durchzuführen. Ein Eintauchen der bereits abgeschabten Mucosa in flüssigen Stickstoff ist gegenüber der sofortigen Enzyminaktivierung durch Eiweißfällung von keinem weiteren Zeitvorteil.

KIMURA et al (71) verglichen die Einflüsse von Decapitation, Eintauchen in flüssigen Stickstoff und Narkose mit Äther bzw.

Pentobarbital auf die Spiegel von cAMP und cGMP in verschiedenen Rattengeweben. Dabei variierten die Konzentrationen in den einzelnen Geweben ganz erheblich, maximal um das 17-fache.

Die Excision und Reinigung des Caecums sowie die anschließende Mucosaabschabung sind sicherlich zeitaufwendig. Wir konnten in der bisher veröffentlichten Literatur keine Angaben darüber finden, wie der Zeitabstand zwischen Eröffnung des Bauchraums und Gewebsinaktivierung die Konzentrationen von cyclischen Nucleotiden in der Darmschleimhaut verändert. Aus dem nun von uns gefundenen Zeitverlauf des cAMP-Spiegels (Abb. 18) geht klar hervor, daß verwertbare Ergebnisse nur bei möglichst kurzer Dauer der Entnahme erhoben werden, wobei als oberste Grenze etwa 40 sec gefunden wurden. Zwischen 40 und 70 sec Entnahmezeit stiegen die cAMP-Konzentrationen an und zeigten vor allem ganz erhebliche Schwankungen. Ein ähnlicher Zeitverlauf wurde im Gehirn von Ratten nach Decapitation gefunden (139). Aus diesem Grunde und weil die Gewebeentnahme im Normalfall etwa 30 sec dauerte, setzten wir in unseren Versuchen als Entnahmezeit das Intervall zwischen 30. und 35. Sekunde fest. Entnahmezeiten unter 20 sec gelangen nicht. Aus der relativen Konstanz der Konzentrationen zwischen 20. und 40. Sekunde läßt sich aber mit einiger Sicherheit folgern, daß sich hier keine wesentlichen Änderungen des cAMP-Spiegels abspielten. Dafür spricht auch, daß andere methodische Varianten vergleichbare Konzentrationen von cyclischen Nucleotiden am Caecum, Colon und Dünndarm von Ratten oder Kaninchen ergaben (13,29,42,106).

Bei den in vivo-Versuchen schabten wir die Epithelzellen von den darunterliegenden Gewebsschichten ab. Dadurch wird, wie früher (110) nachgewiesen, eine praktisch reine Epithelzellfraktion gewonnen. Anders liegen die Verhältnisse bei der Schleimhautgewinnung in vitro. Hierbei wird die gesamte Mucosa einschließlich der Muscularis Mucosae verwendet (Abb. 8), so daß außer Epithelzellen auch Muskel-, Gefäß- und Bindegewebszellen miterfaßt werden. Es ist daher a priori nicht zu erwarten, daß die Konzentrationen der cyclischen Nucleotide in der

abgeschabten und in vitro isolierten Mucosa völlig identisch sind. Hinzu kommen in vitro als zusätzliche, möglicherweise modifizierende Faktoren die Inkubation in Ringerlösung, die schlechteren metabolischen Bedingungen sowie die Abwesenheit humoraler und neurogener Reize. Trotzdem waren die cAMP-Konzentrationen in vitro und in vivo fast gleich und nur die cGMP-Konzentrationen in vitro halb so groß wie in vivo.

4.1.2 Vergleich der Trennungsmethoden von cAMP und cGMP
Anfangs führten wir die Säulentrennung mittels QAE Sephadex A 25-Säulen (I; 125) durch. Im Vergleich zur Trennung mittels Aluminiumoxyd- und Dowex-Säulen (II; 63) war dabei die Säulenvorbereitung und die Enzyminaktivierung relativ umständlich. Während bei der verbesserten Methodik II nur eine Mischfraktion von 0,5 ml verworfen wurde, mußten wir zur cAMP- und cGMP-Trennung bei Methodik I 4 ml verwerfen. Um durch später eluierende Nucleotide keine Verunreinigung der cGMP-Fraktion zu bekommen (125), wurde bei dieser Methodik zusätzlich das zum Schluß eluierende cGMP verworfen. Beides führte zu relativ hohen Verlusten vor allem von cGMP, was die spätere Ausbeutestimmung (cAMP 52 %, cGMP 29 %) bestätigte. Außerdem eluierte bei dieser Methode noch ein relativ hoher cAMP-Anteil in der cGMP-Fraktion (Abb. 9), so daß dadurch die cGMP-Ausbeute verfälscht werden konnte.

Insgesamt veranlaßten uns diese Gründe, im Verlauf der Untersuchungen auf die verbesserte und zudem technisch einfachere Methode II überzugehen. Bei dieser Methode betrug die Ausbeute von cAMP im Mittel 71 %, von cGMP 65 %. Die mit Methode I erhaltenen Ergebnisse von cGMP wurden bei der endgültigen Auswertung wegen der niedrigen Ausbeute und der möglichen Interferenz von cAMP nicht berücksichtigt. Beide Einwände entfallen bei cAMP weitgehend, so daß kein Anlaß bestand, die mit Methode I gewonnenen cAMP-Daten ebenfalls zu eliminieren.

4.1.3 Bestimmungsmethoden von cAMP und cGMP

Die Darstellung des Bindungsproteins nach MIYAMOTO (94) in der Modifikation nach TRABER (148) ist bei unterbrechungs-

losem Arbeiten binnen einer Woche gut durchzuführen. Da derzeit von der Industrie angebotene cAMP-Tests sehr teuer sind, bringt die eigene Darstellung von Proteinkinase eine große Kostenersparnis mit sich. Bei Lagerung bei -60° C konnten wir die Proteinkinase für mehrere Jahre ohne Aktivitätsverlust aufbewahren.

Wir erprobten zwei Bestimmungsmethoden für cAMP. Beide brachten identische Ergebnisse. Bei der derzeit am häufigsten benutzten Methode nach GILMAN (47) betrug die untere Nachweisgrenze 1 pMol (Abb. 14), während wir in der später beschriebenen Modifikation nach BROSTROM (15) exakte Werte bis zu etwa 0,2 pMol (Abb. 15) erhielten (Variationskoeffizient 12,6). Von wesentlichem Vorteil bei der Methode nach BROSTROM ist das Wegfallen der Filtrierung, da erstens filterbedingte Fehlerquellen (Undichtigkeit, ungenügendes Auflösen im Zählgläschen) entfallen und zweitens der Arbeitsaufwand wesentlich geringer wird. Wegen der Entfernung der R-Untereinheiten der Proteinkinase mit Histon (15) ist bei dieser Methode außerdem die Gesamtaktivität der Proteinkinase höher. Aus diesen Gründen gingen wir bei den in vitro-Versuchen auf die Methode nach BROSTROM über. Radioimmunologische Bestimmungsmethoden für cAMP erschienen zum Zeitpunkt des Versuchsbeginns noch nicht genügend ausgereift, und ihre höhere Empfindlichkeit für unsere Zwecke nicht erforderlich.

Für die Bestimmung von cGMP benötigten wir wegen der geringen Konzentration in der Darmschleimhaut eine niedrigere untere Nachweisgrenze. Wir entschieden uns für einen Radioimmunoassay (140), womit wir bis zu 20 fMol cGMP nachweisen konnten (Abb. 16). Das dazu nötige ^{125}J -cGMP und den cGMP-Antikörper aus Hasenplasma erhielten wir aus dem Labor SCHULTZ. Der durchschnittliche Variationskoeffizient von 20 ist in Anbetracht der geringen cGMP-Mengen niedrig. Als Alternativmethoden gibt es derzeit verschiedene andere Radioimmunoassay sowie Proteinbindungstests mit aus Seidenspinnerräupen oder Hummerschwänzen gewonnener Proteinkinase. Die gebräuchlichen cGMP-Bestimmungsmethoden wurden von JAKOBS et al (63) zusammenfassend diskutiert. Hierbei

erwies sich der von uns benutzte Radioimmunoassay als den anderen Methoden überlegen oder zumindest gleichwertig.

Zur Proteinbestimmung verwendeten wir die derzeit allgemein gebräuchliche Methodik nach LOWRY (87), welche in unserem Labor bereits eingeführt war (110,120).

4.2 Zu den Ergebnissen

4.2.1 Cyclische Nucleotide in der normalen und adaptierten Caecumschleimhaut in vivo

4.2.1.1 cAMP

Die von uns in vivo erhaltenen cAMP-Spiegel lagen bei 8 pMol/mg Protein. Dies entspricht etwa den von anderen Gruppen im Rattencaecum bzw. Rattendünndarm in vivo gemessenen Konzentrationen von 6-7 pMol/mg (29,106). Zwar fanden sich an den einzelnen Versuchstagen Schwankungen zwischen 7 und 10,7 pMol/mg, doch überschreiten diese Streuungen nicht das als Summe der biologischen und methodischen Schwankungen zu erwartende Ausmaß. Der Tag-zu-Tag-Vergleich zwischen Kontroll- und PEG-Tieren sollte dazu dienen, diese Schwankungen auf ein Mindestmaß zu reduzieren.

Im Verlauf der Caecumadaptation waren die cAMP-Konzentrationen im Vergleich zu Kontrolltieren unverändert. Eine Ausnahmebeobachtung waren die nach 14-tägiger PEG-Fütterung erniedrigten cAMP-Konzentrationen, die aber nur gegenüber den am gleichen Tag operierten Kontrollen, nicht gegenüber dem Gesamtkontrollkollektiv signifikant waren. Der Befund ist also nicht eindeutig genug, um für das Verständnis des Adaptationsprozesses Wesentliches beizutragen. Zu allen anderen Zeitpunkten der Adaptation fanden sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Damit ist ein Zusammenhang mit Wachstum oder Elektrolyttransport des Caecums nicht offensichtlich. Daß sich die cAMP-Konzentration bei stimulierter Na-Resorption am Caecum nicht ändert, ist für die Interpretation des Transportmechanismus von Bedeutung (s. 4.2.3).

Auch nach zweistündiger Resorption von Elektrolyten und Wasser in vivo zeigte sich im cAMP-Spiegel weder zwischen Kontrolltieren und Tieren mit Caecumadaptation, noch im Vergleich zur sofortigen Gewebssentnahme ein Unterschied. Daraus kann geschlossen werden, daß Ersatz des normalen Caecuminhalts durch die Elektrolytlösung die Konzentration des cyclischen Nucleotids nicht berührt. Da bei diesen Versuchen die gleichen experimentellen Bedingungen vorlagen wie bei früheren Messungen des Elektrolyttransports in vivo (85,86), können die jetzigen cAMP-Konzentrationen direkt mit den früheren Ergebnissen in Beziehung gesetzt werden.

4.2.1.2 cGMP

Die Konzentration von cGMP in der Caecummucosa beträgt nach unseren Messungen 600 fMol/mg Protein. In der Schleimhaut des Rattendünndarms wurden gleiche Konzentrationen - ebenfalls 600 fMol/mg - gemessen (106), während in vivo-Vergleichsmessungen für das Rattencaecum oder -Colon bisher nicht vorliegen. Damit beträgt der cGMP-Gehalt der Caecummucosa etwa 1/10 - 1/15 des cAMP-Gehalts, ein Verhältnis, das im Rattendünndarm ebenfalls gefunden wurde (106).

Der zweifellos interessanteste Befund unserer Untersuchungen war, daß Tiere mit adaptiertem Caecum im Vergleich zu Normaltieren hochsignifikant erniedrigte cGMP-Spiegel in der Caecumschleimhaut aufwiesen. Der Abfall erfolgte dabei nicht linear, sondern in den ersten 1 - 2 Wochen steil und dann nur mehr langsam. Ein ähnlicher Zeitverlauf war bei früheren Untersuchungen für den Anstieg der Nettonatrium- und Wasserresorption sowie der Na-K-ATPase in der adaptierenden Caecumschleimhaut gefunden worden (86,120). Abbildung 26 stellt den zeitlichen Abfall von cGMP dem Anstieg der Na-K-ATPase-Aktivität (120) gegenüber. Beide Kurven zeigen ein spiegelbildliches Verhalten. Dieser Befund läßt an einen ursächlichen Zusammenhang zwischen beiden Parametern und damit auch zwischen cGMP und dem Natriumtransport denken. Auf der anderen Seite stellt ein zeitlich paralleles Verhalten noch keinen Beweis für einen direkten Zusam-

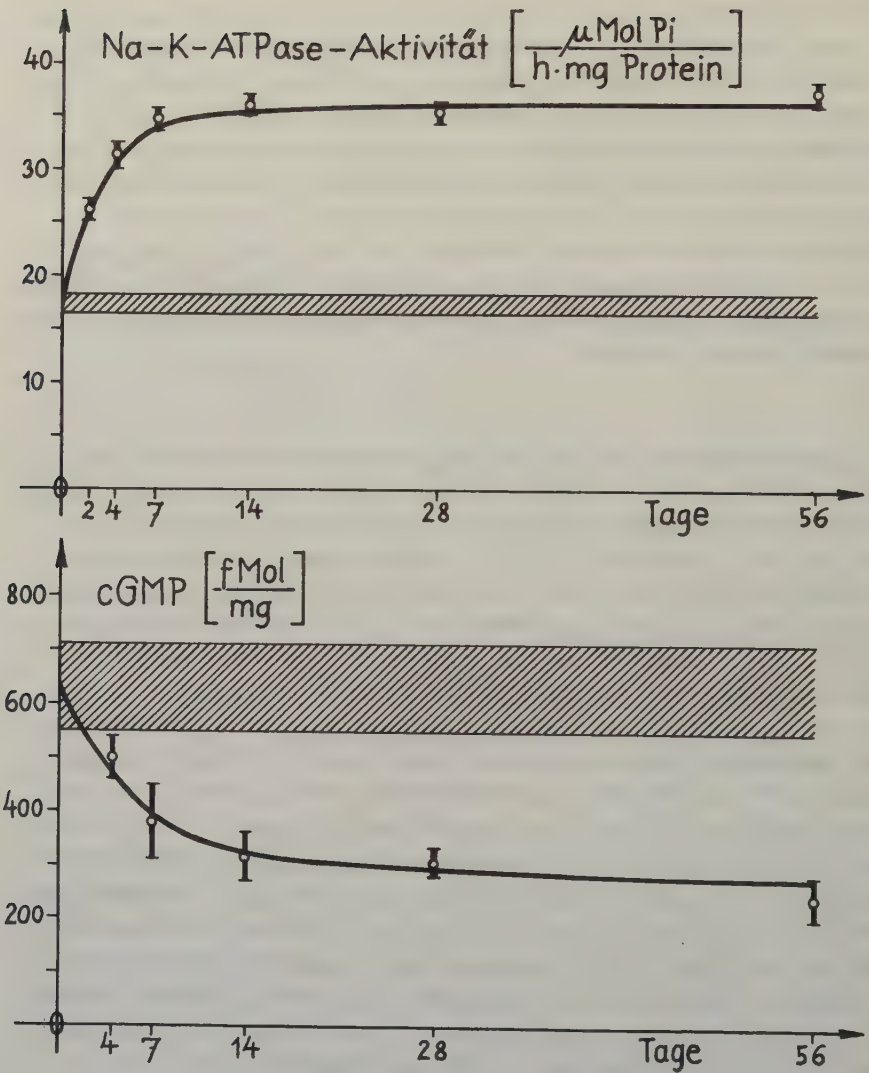


Abb. 26 Zeitverlauf des Anstiegs der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase (aus 120) im Vergleich zum Abfall der cGMP-Spiegel (in fMol/mg Protein) im normalen und adaptierten Caecum von Ratten; schraffierter Bereich = Kontrolltiere; $\bar{x} \pm \text{SEM}$.

menhang dar. Ursache des parallelen Verlaufs beider Kurven könnte auch ein gemeinsamer dritter Faktor sein oder ein kausaler Zusammenhang könnte vollständig fehlen. Schließlich könnte auch das Wachstum des Caecums den cGMP-Spiegel beeinflussen. In den folgenden Kapiteln wird auf die Vorstellung, daß ein Zusammenhang mit dem Elektrolyttransport am wahrscheinlichsten ist, noch ausführlicher eingegangen werden.

4.2.2 Cyclische Nucleotide und elektrische Parameter in vitro

4.2.2.1 cAMP

Mit etwa 10 pMol/mg Protein lagen die basalen cAMP-Spiegel der Caecumschleimhaut in vitro geringfügig höher als in vivo, waren aber zwischen Kontrollen und Tieren mit Caecumadaptation nicht verschieden. Dies bestätigt die in vivo-Ergebnisse, bei denen ebenfalls keine Unterschiede zwischen Kontrollen und Adaptation gefunden wurden.

Theophyllinzugabe führte zu einer Zunahme des cAMP-Spiegels im Caecum auf das 6- bis 10-fache. Bisher liegen keine Untersuchungen über den Effekt von 10 mM Theophyllin an die cAMP-Spiegel des Caecums der Ratte vor. Der von uns gefundene Anstieg ist etwa doppelt so groß wie derjenige, der am Kaninchenileum nach 10 mM Theophyllin beobachtet wurde (1,42).

Bei Tieren mit früherer oder späterer Adaptation (4 oder 14 Tage) stieg nach Theophyllinzugabe der cAMP-Spiegel statistisch nicht anders an als bei Kontrolltieren. Da 10 mM Theophyllin den Abbau von cAMP durch Phosphodiesterasen weitgehend oder sogar komplett (101) hemmt, bedeuten diese Ergebnisse, daß nicht nur die stationären Konzentrationen, sondern auch die Bildung von cAMP pro Zeiteinheit bei adaptierten und Normaltieren etwa gleich ist. Damit scheint sich der Umsatz von cAMP während der Adaptation nicht wesentlich zu ändern.

4.2.2.2 cGMP

Im Vergleich zu den in vivo gefundenen cGMP-Spiegeln von Kon-

trolltieren waren die Werte in vitro mit 300 fMol/mg Protein nur etwa halb so groß. In vitro wurden bisher keine cGMP-Werte im Rattencaecum bestimmt. BRASITUS et al berichteten über in vitro-Konzentrationen von cGMP an der isolierten Ileummucosa des Kaninchens, die mit 35 fMol/mg Protein (13) sogar um das 20-fache niedriger lagen als sie normalerweise in vivo in menschlichem und tierischem Darm gefunden wurden (25,26, 106). Diese sehr niedrigen Konzentrationen scheinen jedoch insofern ein Ausnahmefall zu sein, als in einer neueren Arbeit (35) in vitro-Konzentrationen von 300 fMol/mg auch am Kaninchenileum gemessen wurden.

Während früher (4 Tage) bzw. später (14 Tage) Adaptation waren die cGMP-Spiegel zwar wie in vivo niedriger als bei Kontrolltieren. doch war dies statistisch nicht signifikant. Die Deutung dieser Diskrepanz zwischen in vivo- und in vitro-Daten muß vorläufig offen bleiben. Denkbar ist, daß dabei die schlechtere metabolische Situation der Schleimhaut in vitro eine Rolle spielt, auf die u.a. der allmähliche Abfall von elektrischer Potentialdifferenz und Kurzschlußstrom hinweist.

Nach Theophyllinzugabe stiegen die cGMP-Spiegel bei Kontrollen auf das 3,7-fache des Ausgangswerts an. Dieser Effekt entspricht dem Anstieg von cGMP nach Theophyllin in anderen Geweben (51). Nach 4- bis 14-tägiger Adaptation war nach Theophyllinzugabe die cGMP-Akkumulation geringer; mit einem Anstieg auf das 2,2-fache gegenüber einem 3,7-fachen Anstieg bei Kontrollen wurde der Unterschied nach 14 Tagen Adaptation signifikant. Zu diesem Zeitpunkt ist der cGMP-Spiegel bereits auf das endgültige Niveau erniedrigt, so daß auf ein Gleichgewicht zwischen cGMP-Bildung und -Abbau geschlossen werden muß. Daher werten wir den verminderten Anstieg nach Theophyllin als einen Hinweis darauf, daß es bei der Adaptation zu einem herabgesetzten cGMP-Umsatz kommt. Allerdings erfordert eine detaillierte Untersuchung des cGMP-Umsatzes Bestimmungen der Aktivität der Guanylatcyclasen und cGMP-Phosphodiesterasen, eventuell auch zusätzlich von Modulatoren des cyclischen Nu-

cleotidstoffwechsels, die in der gegenwärtigen Arbeit nicht durchgeführt wurden.

4.2.2.3 Elektrische Parameter

Die Messung der elektrischen Parameter *in vitro* sollte primär der Bestimmung der Vitalität der Caecummucosa unter diesen Bedingungen dienen. Derartige Messungen waren bisher an der adaptierenden Caecumschleimhaut nicht durchgeführt worden, so daß sich zusätzlich neue und die früheren *in vivo*-Messungen ergänzende Befunde ergaben.

An *in vitro* inkubierter Schleimhaut von PEG-Tieren waren die elektrische Potentialdifferenz (PD), der Kurzschlußstrom (KSS) und der Widerstand (R) gegenüber der Schleimhaut von Kontrollen erhöht. Dies bestätigte die *in vivo*-Befunde, nach denen die e.l. PD während des Adaptationsprozesses ansteigt (85,86), die Erhöhung des Widerstands in der adaptierten Schleimhaut könnte ein Hinweis auf eine Verminderung des parazellulären Shunts sein. KSS und R waren *in vivo* nicht bestimmt worden. Die Potentialdifferenzen waren absolut gesehen niedriger als *in vivo*, der Unterschied zwischen den beiden Tiergruppen war jedoch prozentual etwa gleich wie *in vivo*.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurden inzwischen erweiterte Messungen der elektrischen Parameter und unidirektionaler Elektrolytflüsse *in vitro* durchgeführt (52). Diese bestätigten die Steigerung der PD, des KSS und von R. Die unidirektionalen Natriumflüsse erwiesen sich von der Mucosa zur Serosa als erhöht bei nur wenig verändertem Serosa- zu Mucosa-Fluß. Demzufolge war die Nettonatriumresorption bei Adaptation *in vitro* - wie *in vivo* - (85,86) signifikant gesteigert, und zwar offenbar aufgrund einer Stimulation der aktiven Resorptionskomponente. Zwischen dem Nettonatriumtransport und dem Kurzschlußstrom ergab sich bei beiden Tiergruppen eine Differenz, woraus geschlossen werden kann, daß der KSS am Caecum nicht allein durch den Nettonatriumtransport bestimmt wird.

Nach Theophyllin stiegen bei uns PD und KSS an. Ein Anstieg dieser Parameter nach Theophyllin konnte auch im Kaninchenileum, Kaninchencolon und Rattencolon festgestellt werden (9,28,29,37,40,46,105). FRIZZELL (46) führte den gesteigerten KSS nach cAMP-Erhöhung im Kaninchencolon auf eine aktive elektrogene Chloridsekretion zurück, während die Elektrogenität der cAMP-induzierten Chloridsekretion am Ileum zumindest im Fall der Cholera noch umstritten ist (28,38,105). Auch am Rattencolon induzierte Theophyllin eine elektrogene Chloridsekretion in das Lumen (9), so daß in dieser Hinsicht ein gleicher Mechanismus für das Kaninchen- und Rattencolon postuliert werden kann. Es könnte also auch die bei uns nach Theophyllin beobachtete Erhöhung des KSS durch eine Chloridsekretion hervorgerufen sein.

In unseren Versuchen stiegen PD und KSS in beiden Tiergruppen nach Theophyllin zwar prozentual gleich an, jedoch war der numerische Anstieg bei Adaptation wesentlich höher als unter Kontrollbedingungen. Für diesen numerisch höheren Anstieg an der adaptierten Schleimhaut dürfte eine zusätzliche Erhöhung der aktiven Natriumresorption durch Theophyllin nicht verantwortlich sein, da nach Theophyllin keine Stimulierung der Na-K-ATPase bekannt ist. Somit ist als Ursache des überproportional hohen KSS-Anstiegs die Stimulierung eines anderen elektrogenen Transportprozesses in Betracht zu ziehen, für den z.B. die elektrogene Chloridsekretion in Frage kommt. Die vorliegenden Daten sind aber u.a. wegen der Unkenntnis der relevanten Chloridflüsse nicht ausreichend, um eine solche Folgerung abzuleiten.

Der transmurale Widerstand R fiel bei unseren Versuchen nach Theophyllin bei beiden Tiergruppen um etwa 10 % ab. Nach Zugabe von Theophyllin zum Kaninchenileum wurde dagegen über einen Anstieg des Widerstands berichtet (37,103,105,135), was auf eine cAMP-induzierte Verminderung des parazellulären Shunts zurückgeführt wurde (28,105). Andererseits stimmen unsere Auswertungen des Widerstands gut mit einem gleichartigen Abfall am Colon so-

wohl des Kaninchens als auch der Ratte überein (9,46,29). Es wurde daher postuliert, daß cAMP in Geweben mit hohem Ausgangswiderstand - wie dem Colon oder Caecum mit 80 - 100 Ohm . cm² - den parazellulären Shunt herabsetzt, während es in Geweben mit niedrigem Ausgangswiderstand - wie dem Ileum mit 20 - 50 Ohm . cm² - den Shunt-Widerstand erhöht (23). Die Ursache dieses Verhaltens ist bisher ungeklärt.

4.2.3 Änderung cyclischer Nucleotide bei der Adaptation

4.2.3.1 Möglicher Zusammenhang mit dem Wachstum

Bei unseren Untersuchungen erwiesen sich die stationären Konzentrationen und der Umsatz von cAMP im wesentlichen als unverändert, damit konnte auch kein Zusammenhang zwischen cAMP und dem Wachstum festgestellt werden. Da es sich bei unserem Modell um nicht synchronisierte Zellen handelt, können natürlich Variationen des cAMP-Spiegels innerhalb einzelner Phasen des Zellcyclus (Abb. 3) nicht erfaßt werden. Ein gewisser Hinweis auf einen geänderten cAMP-Umsatz könnte allenfalls darin gesehen werden, daß die Konzentration des Nucleotids nach Theophyllin während der frühen (4 Tage) Wachstumsphase stärker anstieg als in der späteren (14 Tage). Beide Werte waren jedoch von den Kontrollen statistisch nicht signifikant verschieden.

Auf der anderen Seite fiel die Konzentration von cGMP in vivo im Zuge der Adaptation ab, während in vitro ein verminderter Anstieg nach Theophyllin auf einen verminderten cGMP-Umsatz hinwies. Die stationären Konzentrationen von cGMP in wachsenden Geweben wurden in der Mehrzahl der Fälle erhöht gefunden (26,50,134), ein Verhalten, das den am adaptierenden Caecum jetzt erhobenen Befunden entgegengesetzt ist und somit eher gegen einen Zusammenhang des cGMP-Spiegels mit dem Wachstum des Caecums spricht.

Im Darm werden die neuen Zellen im Kryptengrund gebildet. Sie wandern im Laufe der Differenzierung lumenwärts, um schließlich apikal abgestoßen zu werden (11,19,79). Bei Untersuchungen am Rattenileum stellte man fest, daß die Konzentration von cGMP von den mitotisch aktiven Kryptenzellen bis hin zu den differenzier-

ten apikalen Zellen kontinuierlich abnimmt, wobei die Konzentration von cAMP unverändert bleibt oder sich nur gering vermindert (106,151). Da zu erwarten ist, daß sich beim adaptativen Caecumwachstum die Anzahl der mitotisch aktiven Zellen erhöht, sprechen auch diese Befunde gegen einen Zusammenhang zwischen cGMP- A b f a l l und Wachstum.

Ein drittes indirektes Indiz gegen einen wachstumsbedingten cGMP-Abfall läßt sich aus dem Zeitverlauf herleiten. Die DNS-, RNS- und Proteinzunahme der Schleimhaut erfolgt in den ersten zwei Wochen der Adaptation rasch, um in den nachfolgenden 6 Wochen allmählich abzuflachen. Wäre das Absinken des cGMP-Spiegels wachstumsbedingt, sollte man daher vor allem in den ersten Tagen der Adaptation erniedrigte cGMP-Spiegel erwarten, nach mehreren Wochen jedoch wieder eine Annäherung an die Norm. Der tatsächlich beobachtete Zeitverlauf mit dem progredienten Abfall in den ersten zwei Wochen und der anschließenden Stabilisierung auf dem tiefen Niveau läßt sich folglich kaum mit dem Wachstumsprozeß erklären.

Weitere interpretatorische Hilfen lassen sich aus Beobachtungen an einem anderen, in mancher Hinsicht vergleichbaren epithelialen Gewebe herleiten. Nach kontralateraler Nephrektomie kommt es in der Restniere ebenfalls zu einem Wachstum, wobei ähnlich wie am Caecum die Natriumnettoresorption pro Masse und die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase (66) adaptativ ansteigen. Die Steigerung der Natriumresorption wird jedoch erst nach einer Woche signifikant, während das Wachstum unmittelbar postoperativ einsetzt. In den ersten 72 Stunden fand man die cGMP-Konzentration erhöht (122), Daten nach längeren Zeitintervallen liegen leider nicht vor. Erhöhte cGMP-Konzentrationen ergaben sich ferner beim Nierenwachstum in der Neonatalperiode von Ratten (122). Somit geben auch die Messungen an der Niere keinen Hinweis auf eine Erniedrigung der cGMP-Spiegel während des Wachstums. Ein interessanter Zusatzbefund war, daß die Aktivität der löslichen Guanylatcyclase anstieg, während die Aktivität der membrangebundenen Guanylatcyclase abfiel. Für die wachstumsbedingte cGMP-

Erhöhung war also die lösliche Guanylatcyclase verantwortlich. Im Gegensatz zur Niere ist dieses Enzym jedoch in der Darmschleimhaut von Ratten kaum vorhanden (70), so daß Bestimmungen der Aktivität der löslichen und membrangebundenen Guanylatcyclase am Caecum zusätzliche Informationen liefern könnten.

Aus unseren Befunden der cAMP- und cGMP-Konzentrationen ließ sich also kein Zusammenhang zwischen den Konzentrationen cyclischer Nucleotide und dem Caecumwachstum ableiten, soweit eine alleinige Bestimmung von c-Nucleotidkonzentrationen in der Gesamtschleimhaut nicht synchronisierter Zellen eine solche Aussage erlaubt.

4.2.3.2 Möglicher Zusammenhang mit dem Elektrolyttransport
Das in der Einleitung (1.5) besprochene Modell des intestinalen Elektrolyttransports (46,130) sieht als aktive Mechanismen für die Resorption eine an der basolateralen Zellmembran lokalisierte Natriumpumpe und für die Sekretion eine an der luminalen Zellmembran gelegene Chlorid(-Natrium)-pumpe vor. Die aktive Natriumresorption ist mit der Na-K-ATPase, die aktive Chloridsekretion mit cAMP eng verknüpft. Beide Transportprozesse sind voneinander unabhängig.

Die in der adaptierenden Caecumschleimhaut gemessenen cAMP-Konzentrationen lassen sich mit dieser Vorstellung gut vereinbaren. Bei einer unabhängigen Regulation beider Transportsysteme kann, wie hier, die Resorption (Na-K-ATPase) erhöht, die Sekretion (cAMP) aber unverändert sein. Darüber hinaus sprechen die Befunde am Caecum dafür, daß das größtenteils aus Akutversuchen abgeleitete Modell (46,130) auch gilt, wenn es zu einer chronischen Adaptation der Na-K-ATPase kommt. Demnach scheinen Resorption und Sekretion sowohl bei der akuten als auch bei der chronischen Transportänderung nicht miteinander gekoppelt zu sein.

Die gleiche Interpretation läßt sich aus Experimenten ableiten, in denen die Natriumresorption und die spezifische Aktivität

der Na-K-ATPase durch chronische Applikation von Methylprednisolon am Rattenileum erhöht wurde (16). Unter diesen Bedingungen reduzierte Choleraagen (über eine Adenylat-Cyclase/cAMP-induzierte Sekretion) zwar die Natriumnettoresorption, ließ aber die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase unbeeinflusst. Im umgekehrten Akutexperiment konnte eine durch Choleraagen hervorgerufene Nettosekretion durch nachträgliche Gabe von Methylprednisolon über eine Stimulierung der Na-K-ATPase in eine Nettoresorption umgewandelt werden (16). Die zuletzt genannten Befunde stehen allerdings in Widerspruch zu früheren Experimenten an gereinigten Plasmamembranen des Kaninchenileums, in denen Cholera-toxin die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase akut erniedrigte (99). Insgesamt führte die Mehrzahl der Untersuchungen am Kaninchencolon, Rattenileum und auch am Kaninchenileum dennoch zu dem Schluß, daß cAMP lediglich an der Regulierung der Sekretion beteiligt ist und das Na-K-ATPase-System unbeeinflusst läßt (1,38,46,104).

Für cGMP ist in diesem Transportmodell keine Rolle vorgesehen. In unseren Versuchen fiel der cGMP-Spiegel während der Adaptation der Caecummucosa ab und zeigte insbesondere eine auffällige zeitliche Parallelität zum Anstieg der Na-K-ATPase. Deshalb hatten wir in Abbildung 26 beide Zeitverläufe einander gegenübergestellt. Die Adaptation der Na-K-ATPase war zu einem Zeitpunkt (7 - 14 Tage) abgeschlossen, zu dem auch die Abnahme der cGMP-Konzentration beendet war. Da die spezifische Aktivität der Na-K-ATPase und die Natriumnettoresorption zeitparallel zueinander ansteigen (86), hieße das, daß ein Zusammenhang zwischen cGMP-Spiegel und Natriumnettoresorption bzw. aktiver Natriumresorption (85,86) bestehen könnte.

Es gibt sehr wenige Daten anderer Autoren, die sich in gleichem Sinne interpretieren lassen. Immerhin fanden QUILL & WEISER (106) im Rattendünndarm in den Villi erniedrigte und in den Krypten erhöhte cGMP-Spiegel. Andere Untersucher stellten in den Villi des Rattendünndarms hohe, in den Krypten niedrige spezifische Aktivitäten der Na-K-ATPase fest (18). Nach diesen

Daten besteht also eine inverse Korrelation zwischen cGMP und Na-K-ATPase während des Zellreifungsprozesses von der Krypte zum Villus.

Demgegenüber beobachteten BRASITUS et al einen Anstieg von cGMP bei der durch alphaadrenerge Substanzen induzierten Steigerung der aktiven (13,38,41) Natriumresorption im Kaninchenileum (13). Wegen des gleichzeitigen Anstiegs von cGMP und Natriumresorption vermuteten die Autoren eine positive Korrelation zwischen beiden Größen. Diese Vorstellung ist der hier vorgetragenen Hypothese entgegengesetzt. Es bietet sich jedoch eine beide Ergebnisse vereinende Interpretation an, die vorläufig allerdings spekulativ ist.

Ein grundsätzlicher Unterschied zwischen den Versuchen von BRASITUS et al und den unsrigen liegt darin, daß in den Experimenten am Ileum die Resorptionserhöhung akut ausgelöst wurde, während sie am Caecum chronisch ist, wahrscheinlich aufgrund eines dauerhaften Mehrbesatzes der basolateralen Zellmembran mit Na-K-ATPase-Molekülen (120,121). Die Mehrresorption im Caecum stellt demnach einen Anpassungszustand dar, welcher wegen der anhaltenden auslösenden Ursache (Diät) aufrechterhalten wird. Demgegenüber bewirkt eine einmalige Katecholamingabe lediglich eine kurzfristige Steigerung von Natriumresorption und cGMP, die nach 10 - 20 min wieder abklingt (13,42).

In der Einleitung wurde bereits darauf hingewiesen, daß die Wirkungen der cyclischen Nucleotide, vor allem die "cGMP-Wirkungen", eng mit dem intrazellulären Calciumspiegel verknüpft sind. In Abbildung 2 ist als möglicher Wirkungsmechanismus von cGMP eine negative feedback-Kontrolle des Ca^{++} -Spiegels berücksichtigt (8,124,129). Diese Möglichkeit ist von BRASITUS et al (13) nicht in Betracht gezogen worden. Es wäre also denkbar, daß die Hormonwirkung primär nicht durch cGMP, sondern durch Ca^{++} hervorgerufen wurde. cGMP könnte dann als negativer feedback-Regulator von Ca^{++} in dem Sinne wirken, daß der Ca^{++} -Effekt

und somit die Natriumresorptionssteigerung unterbrochen werden soll. Der von BRASITUS et al beobachtete Zeitverlauf des cGMP-Anstiegs läßt sich mit dieser Interpretation ebenso gut vereinbaren wie mit der von ihnen angebotenen Deutung eines direkten Zusammenhangs. Da demgegenüber die erhöhte Resorption von Natrium im Caecum auf Dauer beibehalten werden soll, muß die Wirkung eventueller Inhibitoren permanent abgeschwächt sein. Auf diese Weise wäre die erniedrigte cGMP-Konzentration verständlich, falls cGMP in der Tat als Inhibitor der aktiven Natriumresorption fungiert.

Vorausgesetzt, daß diese Vorstellung richtig ist, wäre das von S. G. SCHULTZ et al (46,130) vorgeschlagene Modell des intestinalen Elektrolyttransports in folgender Weise zu ergänzen: Wie bisher angenommen, existieren für die Regulierung der Sekretion und Resorption zwei voneinander unabhängige Systeme. cAMP ist bei der Regulation der Sekretion beteiligt, während cGMP an der Steuerung der Resorption in dem Sinne beteiligt ist, daß die Erhöhung der intrazellulären Nucleotid-Konzentration einer erhöhten Resorption entgegenwirkt. Ein interessanter Aspekt wäre dabei, daß der Bildungsort der Nucleotide und der von ihnen beeinflusste Transportprozeß jeweils an der gegenüberliegenden Zellmembran lokalisiert sind (Abb. 27). Nach dieser Hypothese könnten cAMP und cGMP beim Natriumtransport im Darm die Rolle von "intermembranalen" Boten einnehmen.

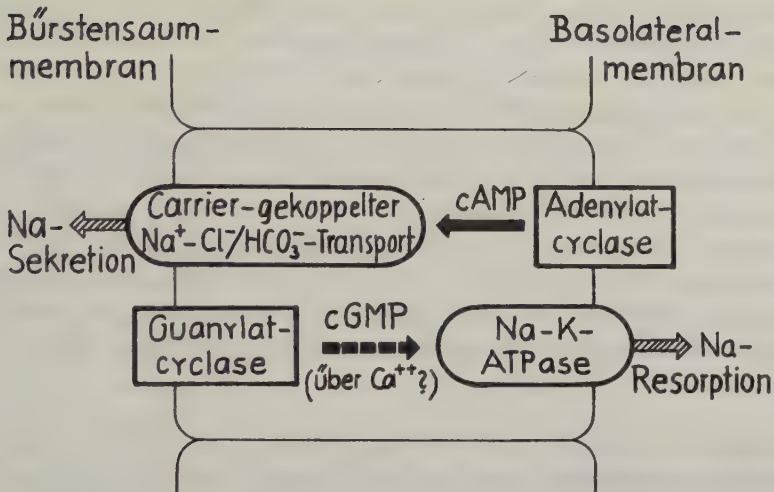


Abb. 27 Hypothetischer Zusammenhang zwischen der Lokalisation der cyclischen Nucleotid-Cyclasen und dem Wirkungsort von cAMP und cGMP auf den Natriumtransport in der Darmschleimhaut. Dabei stimuliert ($\leftarrow$) cAMP wahrscheinlich die Elektrolytsekretion direkt, während cGMP indirekt als negativer feedback-Regulator der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration die Natriumresorption hemmt ($\dashrightarrow$). Beide Nucleotide wirken dabei als "intermembranale" Boten.

5. Zusammenfassung

Im Caecum erwachsener Ratten kann durch Zugabe eines höhermolekularen Polymers zur Diät (Polyäthylenglykol) ein Adaptationsprozeß ausgelöst werden. Bekannt war bisher ein über 2 Monate anhaltendes Organwachstum im Sinne einer Mucosahyperplasie sowie eine rasch einsetzende nach 1 - 2 Wochen abgeschlossene Stimulierung der aktiven Natriumresorption und der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase. Da cyclische Nucleotide bei der Regulation des Elektrolyttransports und des Wachstums wahrscheinlich eine Rolle spielen, untersuchten wir in der vorliegenden Arbeit eventuelle Zusammenhänge zwischen der diätetischen Caecumadaptation und der Konzentration der cyclischen Nucleotide cAMP und cGMP in der Caecummucosa.

1) Methodisch erwies sich für die Trennung von cAMP und cGMP eine Trennungsmethode an Al_2O_3 - und DOWEX 1 x 2-Säulen, für die cAMP-Bestimmung der Proteinbindungstest nach BROSTROM und für die cGMP-Bestimmung eine Modifikation des Radioimmunoassays nach STEINER am geeignetsten.

2) In der abgeschabten Mucosa narkotisierter Tiere *in vivo* betrugen die cAMP-Spiegel bei Kontrollen durchschnittlich 8 pMol/mg Protein. In den verschiedenen Phasen der Adaptation (4, 7, 14, 28, 56 Tage) zeigten sich keine Unterschiede zum Kontrollkollektiv.

Die cGMP-Konzentrationen betrugen bei Kontrollen 600 fMol/mg Protein. Innerhalb der ersten zwei Wochen der Adaptation fielen die cGMP-Spiegel auf die Hälfte ab und verblieben während der übrigen 6 Wochen der Untersuchungszeit auf dem erniedrigten Niveau.

3) In der isolierten Caecumschleimhaut *in vitro* wurden bei Kontrollen cAMP-Spiegel von 10 pMol/mg und cGMP-Spiegel von 300 fMol/mg Protein gefunden. Die adaptierte Schleimhaut wies die gleichen cAMP-Spiegel auf, die cGMP-Spiegel waren gering, aber statistisch nicht signifikant erniedrigt. Durch Hemmung

der Phosphodiesterasen mit Theophyllin wurden Hinweise dafür gewonnen, daß während der Adaptation der cAMP-Umsatz unverändert, der cGMP-Umsatz der Mucosazellen dagegen vermindert ist.

4) Bei diesen in vitro-Untersuchungen wurden zugleich elektrische Parameter in einer Flußkammer gemessen. Dabei ergab sich bei den Tieren mit Caecumadaptation eine Erhöhung des Kurzschlußstroms und der transmuralen elektrischen Potentialdifferenz. Diese Ergebnisse bestätigen und ergänzen vorausgegangene in vivo-Messungen und können im Sinne der früher postulierten Erhöhung der aktiven Natriumresorption im adaptierten Caecum gedeutet werden. Ferner erwies sich der transmurale Widerstand im adaptierten Caecum als erhöht, was auf einen niedrigeren parazellulären Shunt hinweisen könnte.

Nach Zugabe von Theophyllin stiegen Kurzschlußstrom und Potentialdifferenz bei beiden Tiergruppen an, möglicherweise als Ausdruck einer theophyllininduzierten Elektrolytsekretion. Der Gewebswiderstand nahm nach Theophyllin bei beiden Tiergruppen ab, was mit einer Zunahme des parazellulären Shunts unter Theophyllin vereinbar ist.

5) Die cAMP- und cGMP-Daten ließen keinen Zusammenhang zwischen der intrazellulären Konzentration, der cyclischen Nucleotide und dem Wachstum des Caecums erkennen. Demgegenüber sind die Ergebnisse im Rahmen des geänderten Elektrolyttransports interpretierbar und können in ein von S. G. SCHULTZ et al vorgeschlagenes intestinales Transportmodell eingeordnet werden. Demnach bleiben die cAMP-Spiegel bei der adaptativen Erhöhung der aktiven Natriumresorption deshalb unverändert, weil cAMP nur an der Regulation der an der luminalen Zellmembran lokalisierten Sekretion, nicht aber des basolateral gelegenen aktiven Resorptionsprozesses beteiligt ist. Letzterer ist mit der Na-K-ATPase funktionell eng verbunden. In Erweiterung dieses Modells läßt die bei der Caecumadaptation gefundene Erniedrigung der intrazellulären cGMP-Konzentration eine Teilnahme von cGMP am Resorptionssystem möglich erscheinen. Hierfür spricht, daß die cGMP-Abnahme am Caecum zeit-

parallel zur Erhöhung der spezifischen Aktivität der Na-K-ATPase und der Natriumresorption erfolgte. Die Hypothese eines inversen Zusammenhangs zwischen cGMP und aktiver Natriumresorption kann aus der wenigen dazu vorhandenen Literatur gestützt werden, wenn man annimmt, daß cGMP als negativer feedback-Regulator der aktiven Natriumresorption fungiert.

6. Literaturverzeichnis

- 1 Al-Awqati, Q., Field, M., Greenough, W.B. III:
Reversal of cyclic AMP-mediated intestinal secretion
by ethacrynic acid.
J. clin. Invest. 53, 687-692 (1974)
- 2 Appleman, M.M., Terasaki, W.L.:
Regulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase.
in: Adv. cycl. Nucl. Res., 5, 153-162 (1975),
ed. by Drummond G.I., Greengard, P., Robison, G.A.
Raven Press, New York
- 3 Appleman, M.M., Thompson, W.J. Russell, T.R.:
Cyclic nucleotide phosphodiesterases.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 3, 65-98 (1973)
ed. by Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York
- 4 Ashman, D.F., Lipton, R., Melicow, M.M. et al:
Isolation of adenosine 3', 5'-monophosphate and guanosine
3', 5'-monophosphate from rat urine.
Biochim. Biophys. Res. Comm. 11, 330-334 (1963)
- 5 Aurbach, G.D.:
Beta-adrenergic receptors, cyclic AMP, and ion transport
in the avian erythrocyte.
in: Adv. cycl. Nucl. res. 5, 117-132 (1975),
ed. by Drummond, G.I., Greengard, P., Robison, G.A.
Raven Press, New York
- 6 Bennett, V., Cuatrecasas, P.:
Mechanism of activation of adenylate cyclase by vibrio
cholerae enterotoxin.
J. Membr. Biol. 22, 29-52 (1975)
- 7 Berridge, M.J.:
Control of cell division: a unifying hypothesis.
J. Cycl. Nucl. Res. 1, 305-320 (1975)
- 8 Berridge, M.J.:
The interaction of cyclic nucleotides and calcium in the
control of cellular activity.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 6, 1-98 (1975)
ed. by Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York
- 9 Binder, H.J., Rawlins, C.L.:
Effect of conjugated bile salts on electrolyte transport
in rat colon.
J. clin. Invest. 52, 1460-1466 (1973)

- 10 Binder, H.J., Rawlins, C.L.:
Electrolyte transport across isolated large intestinal mucosa.
Amer. J. Physiol. 225, 1232-1239 (1973)
- 11 Bizzozzero, G.:
Über die Regeneration der Elemente der schlauchförmigen Drüsen und des Epithels des Magendarmkanals.
Anat. Anz. 3, 781 (1888)
- 12 Böhme, E., Munske, K., Schultz, G.:
Bildung von cyclischem Guanosin- 3', 5'-monophosphat in verschiedenen Geweben der Ratte.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 264, 220, (1969)
- 13 Brasitus, T.A., Field, M., Kimberg, D.V.:
Intestinal mucosal cyclic GMP: regulation and relation to ion transport.
Am. J. Physiol. 231, 275-282 (1976)
- 14 Brostrom, C.O., Huang, Y-C., Breckenridge, B.M., Wolff, D.J.
Identification of a calcium-binding protein as a calcium-dependent regulator of brain adenylate cyclase.
Proc. natl. Acad. Sci. U.S. 72, 64-68 (1975)
- 15 Brostrom, C.O., Kon, C.:
An improved protein binding assay for cyclic AMP.
Anal. Biochem. 58, 459-468 (1974)
- 16 Charney, A.N., Donowitz, M.:
Prevention and reversal of cholera enterotoxin-induced intestinal secretion by methylprednisolone induction of $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$.
J. Clin. Invest. 57, 1590-1599 (1976)
- 17 Charney, A.N., Gots, R.E., Forman, S.B., Gianella, R.A.:
Activation of intestinal mucosal adenylate cyclase by shigella dysenteriae I enterotoxin.
Gastroenterology 70, 1085-1090 (1976)
- 18 Charney, A.N., Gots, R.E., Giannella, R.A.:
($\text{Na}^+\text{-K}^+$) stimulated adenosinetriphosphatase in isolated intestinal villus tip and crypt cells.
Biochim. Biophys. Acta 367, 265-270 (1974)
- 19 Cheng, H., Leblond, C.P.:
Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine.
Amer. J. Anat. 141, 461-562 (1974)

- 20 Conley, D., Coyne, M., Bonorris, G., Schoenfield, L.:
Inhibition by propranolol of bile acid stimulation of
rabbit colonic adenylate cyclase in vitro.
Gastroenterology 71, 68-71 (1976)
- 21 Conley, D.R., Coyne, M.J., Chung, A., Bonorris, G.,
Schoenfield, L.:
Bile acid stimulation of colonic adenylate cyclase and
secretion in the rabbit.
Amer. J. dig. Dis. 21, 453-458 (1976)
- 22 Conley, D., Coyne, M., Chung, A., Bonorris, G.,
Schoenfield, L.:
Propanolol inhibits adenylate cyclase and secretion
stimulated by deoxycholic acid in the rabbit colon.
Gastroenterology 71, 72-75 (1976)
- 23 Corbett, C.L., Isaacs, P.E.T., Hawker, P.C., Turnberg, L.A.:
Theophylline-induced changes in ion transport and con-
ductance in human small intestinal mucosa.
Nature, 267, 714-717 (1977)
- 24 DeGroot, A.P., Til, H.P., Feron, V.J., Dreef-van der Meulen,
H.C., Willems, M.I.:
Two year feeding and multigeneration studies in rats
with five chemically modified starches.
Fd. Cosmet. Toxicol. 12, 651 (1974)
- 25 de Jonge, H.R.:
Properties of guanylate cyclase and levels of cyclic GMP
in rat small intestinal villous and crypt cells.
FEBS Lett. 55, 143-152 (1975)
- 26 DeRubertis, F.R., Chayoth, R., Field, J.B.:
Content and metabolism of cyclic adenosine 3':5'-monophos-
phate and cyclic guanosine 3':5'-monophosphate in adeno-
carcinoma of human colon.
J. Clin. Inv. 57, 641-649 (1976)
- 27 DeRubertis, F.R., Craven, P.A.:
Properties of the guanylate-cyclase-guanosine 3', 5':
-monophosphate system of rat renal cortex. Activation
of guanylate cyclase and calcium-independent modulation
of tissue guanosine 3', 5':-monophosphate by sodium
azide.
J. biol. Chem. 251, 4651-4658 (1976)
- 28 Desjeux, J.-F., Tai, Y.-H., Powell, D.W., Curran, P.F.:
Effects of cholera toxin on cellular and paracellular
sodium fluxes in rabbit ileum.
Biochim. Biophys. Acta, 448, 352-367 (1976)

- 29 Donowitz, M., Binder, H.J.:
Effect of dioctyl sodium sulfosuccinate on colonic fluid
and electrolyte movement.
Gastroenterology 69, 941-950 (1975)
- 30 Dowling, R.H., Gleeson, M.H.:
Cell turnover following small bowel resection and bypass.
Digestion 8, 176-190 (1973)
- 31 Drummond, G.L., Severson, D.L., Duncan, L.:
Adenyl cyclase, Kinetic properties and nature of fluoride
and hormone stimulation.
J. biol. Chem. 246, 4166-4173 (1971)
- 32 El-Harith, E.A., Dickerson, J.W.T., Walker, R.:
Potato starch and cecal hypertrophy in the rat.
Fd. cosmet. Toxicol. 14, 115-121 (1976)
- 33 Evans, D.J., Chen., L.C., Curlin, G.T. et al:
Stimulation of adenyl cyclase by escherichia coli
enterotoxin.
Nature 236, 137-138 (1972)
- 34 Evans, N., Turner, P.J., Brown, G.A., McNeish, A.S.:
Stimulation of intestinal cyclic-AMP by a heat-stable
toxin of escherichia coli 0148.
Gut 17, 386 (1976)
- 35 Farris, R.K., Tapper, E.J., Powell, D.W., Morris, S.M.:
Effect of aspirin on normal and cholera toxin-stimulated
electrolyte transport.
J. clin. Invest. 57, 916-924 (1976)
- 36 Field, M.:
Intestinal secretion: Effect of cyclic AMP and its
role in cholera.
New Engl. J. Med. 284, 1137-1144 (1971)
- 37 Field, M.:
Ion transport in rabbit ileal mucosa II. Effects of
cyclic 3'5'-AMP.
Amer. J. Physiol. 221, 992-997 (1971)
- 38 Field, M.:
Intestinal secretion.
Gastroenterology 66, 1063-1084 (1974)
- 39 Field, M., Brasitus, T.A., Sheerin, J.E., Kimberg, V.:
Alterations of intestinal ion-transport by hormones and
bacterial enterotoxins - correlations with cyclic nucleo-
tide levels.
Digestion 13, 109 (1975)

- 40 Field, M., Fromm, D., Mc.Coll, I.:
Ion transport in rabbit ileal mucosa I) Na and Cl fluxes
and short-circuit current.
Amer. J. Physiol. 220, 1388-1396 (1971)
- 41 Field, M., Mc.Coll, I.:
Ion transport in rabbit ileal mucosa. III) Effects of
catecholamines.
Am. J. Physiol. 225, 852-857 (1973)
- 42 Field, M., Sheerin, H.E., Henderson, A., Smith, P.L.:
Catecholamine effects on cyclic AMP levels and ion secre-
tion in rabbit ileal mucosa.
Amer. J. Physiol. 229, 86-92 (1975)
- 43 Fisher, K.A., Binder, H.J., Hayslett, J.P.:
Potassium secretion by colonic mucosal cells after
potassium adaptation.
Amer. J. Physiol. 231, 987-994 (1976)
- 44 Folin, O., Ciocalteu, V.:
On tyrosine and tryptophane. Determination in proteins.
J. biol. Chem. 73, 627 (1927)
- 45 Friedman, D.L., Johnson, R.A., Zeilig, C.E.:
The role of cyclic nucleotides in the cell cycle
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 7, 69-114 (1976)
ed. by Greengard, P., Robison, G.A.; Raven Press, New York
- 46 Frizzell, R.A., Koch, M.J., Schultz, S.G.:
Ion transport by rabbit colon. I. Active and passive
components.
J. Membr. Biol. 27, 297-316 (1976)
- 47 Gilman, A.G.:
A protein binding assay for adenosine 3':5'-cyclic
monophosphate.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 67, 305-312 (1970)
- 48 Goldberg, N.D., Dietz, S.B., O'Toole, A.G.:
Cyclic guanosine 3', 5'-monophosphate in mammalian
tissues and urine.
J. biol. Chem. 244, 4458-4466 (1969)
- 49 Goldberg, N.D., Haddox, M.K.:
Cyclic GMP metabolism and involvement in biological
regulation.
Ann. Rev. Biochem. 46, 823-896 (1977)

- 50 Goldberg, N.D., Haddox, M.K., Nicol, S.E., Glass, D.B., Sanford, C.H., Kuehl, F.A. Jr., Estensen, R.:
Biologic regulation through opposing influences of cyclic GMP and cyclic AMP: the YIN YANG hypothesis.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 5, 307-330 (1974), ed. by Drummond, G.I., Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York
- 51 Goldberg, N.D., O'Dea, R.F., Haddox, M.K.:
Cyclic GMP.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 3, 155-224 (1973), ed. by Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York
- 52 Goldner, A.M., Estep, J.A., Loeschke, K.:
Electrical parameters and ion transport across normal and hypertrophical rat caecum.
Pflügers Arch. 365, R 32 (1976)
- 53 Gordon, H.A.:
Keimfreie Tiere in der Forschung: Eine Erweiterung des Konzepts der Reinkultur.
Triangel 7, 108-121 (1965)
- 54 Gordon, H.A., Nakamura, S.:
Elevated level of colloid osmotic pressure in cecal contents of germfree rats.
in: Ann. Meet. Ass. Gnotobiotics, 8 th Oak Ridge, Abstr. Nr.3, Oak Ridge Nat. Lab., Oak Ridge TN (1969)
- 55 Greene, H.L., Stifel, F.B., Herman, R.H.:
Dietary stimulation of sucrase in a patient with sucrase-isomaltase deficiency.
Biochem. Med. 6, 409-418 (1972)
- 56 Hanson, W.R., Osborne, J.W.:
Epithelial cell kinetics in the small intestine of the rat 60 days after resection of 70 per cent of the ileum and jejunum.
Gastroent. 60, 1087-1097 (1971)
- 57 Ho, H.C., Desai, R., Wang, J.H.:
Effect of Ca^{++} on the stability of the protein activator of cyclic nucleotide phosphodiesterase.
FEBS Letters 50, 374-377 (1975)
- 58 Ho, R.J., Russell, T., Asakawa, T.:
The last conversation with Dr. Earl W. Sutherland, Jr.: The feedback regulation of cyclic nucleotides.
Metabolism 24, 257-264 (1975)

- 59 Ho, R.-J., Sutherland, E.W.:
Action of feedback regulator on adenylate cyclase.
Proc. natl. Acad. Sci., U.S. 72, 1773-1777 (1975)
- 60 Hofmann, F., Beavo, J.A., Bechtel, P.J., Krebs, E.G.:
Comparison of adenosine 3':5'-monophosphate-dependent
protein kinases from rabbit skeletal and bovine heart muscle.
J. biol. Chem. 250, 7795-7801 (1975)
- 61 Hokin, L.E.:
The molecular machine for driving the coupled transports
of Na^+ and K^+ is an (Na^+-K^+) -activated ATPase.
TIBS 1, 233-237 (1976)
- 62 Ishikawa, E., Ishikawa S., Davis, J.W., Sutherland, E.W.:
Determination of guanosine 3',5'-monophosphate in tissues
and of guanylyl cyclase in rat intestine.
J. biol. Chem. 244, 6371-6376 (1969)
- 63 Jakobs, K.H., Böhme, E., Schultz, G.:
Determination of cyclic GMP in biological material.
in: Eukaryotic Cell Function and Growth. Regulation by
Intracellular Cyclic Nucleotides. Ed. by Dumont, J.E.,
Brown, B.L., Marshall, N.J., Plenum Press N.Y. & London
295-311 (1976)
- 64 Jervis, E.L., Levin, R.J.:
Anatomic adaptation of the alimentary tract of the
rat to the hyperphagia of chronic alloxan-diabetes.
Nature 210, 391-393 (1966)
- 65 Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives-
Fifteenth Report:
Evaluation of food additives. Some enzymes, modified
starches, and certain other substances:
Toxicological evaluations and specifications and a
review of the technological efficacy of some antioxidants
Tech. Rep. Ser. Wld Hlth Org. 488, (1972)
- 66 Katz, A.I., Epstein, F.H.:
The role of sodium - potassium - activated adenosine
triphosphatase in the reabsorption of sodium in the
kidney.
J. Clin. Invest. 46, 1999-2011 (1967)
- 67 Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Uenishi, K.,
Miyamoto, E.:
Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities
from rat tissues and occurrence of a calcium-plus-magnesium
ion-dependent phosphodiesterase and its protein activator.
Biochem. J. 146, 109-120 (1975)

- 68 Kimberg, D.V.:
Cyclic nucleotides and their role in gastrointestinal secretion.
Gastroenterology 67, 1023-1064 (1974)
- 69 Kimura, H., Murad, F.:
Increased particulate and decreased soluble guanylate cyclase activity in regenerating liver, fetal liver, and hepatoma.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 72, 1965-1969 (1975)
- 70 Kimura, H., Murad, F.:
Two forms of guanylate cyclase in mammalian tissues and possible mechanisms for their regulation.
Metabolism 24, 439-445 (1975)
- 71 Kimura, H., Thomas, E., Murad, F.:
Effects of decapitation, ether and pentobarbital on Guanosine 3', 5'-Phosphate and adenosine 3', 5'-phosphate levels in rat tissues.
Biochim. Biophys. Acta 343, 519-528 (1974)
- 72 Kuo, J.F.:
Divergent actions of protein kinase modulator in regulating mammalian cyclic GMP-dependent and cyclic AMP-dependent protein kinases.
Metabolism 24, 321-329 (1975)
- 73 Kuo, J.F.:
Reciprocal changes in levels of guanosine 3':5'-monophosphate-dependent and adenosine 3':5'-monophosphate-dependent protein kinases in developing guinea pig lungs.
J. Cycl. Nucl. Res. 1, 151-157 (1975)
- 74 Kuo, J.F., Shoyi, M., Kuo, W.N.:
Stimulatory modulator of guanosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase from mammalian tissues.
Biochim. biophys. Acta 437, 142-149 (1976)
- 75 Langan, T.A.:
Protein kinases and protein kinase substrates.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 3, 99-153 (1973) ed. by Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York
- 76 Leegwater, D.C., De Groot, A.P., van Kalmthout-Kuyper, M.:
The aetiology of cecal enlargement in the rat.
Fd. Cosmet. Toxicol. 12, 687-697 (1974)

- 77 Lehotay, D.C., Levey, G.S., Vesely, D.L., Bornet, E.P., Ray, M.V., Entman, M.L., Schwartz, A.:
The effect of adenylate cyclase inhibitor (ACI) on guanylate cyclase, phosphodiesterase and other enzymes in heart.
J. cycl. Nucl. Res. 3, 55-65 (1977)
- 78 Lin, Y.M., Cheung, W.Y.:
Cyclic 3':5'-nucleotide phosphodiesterase. A theoretical account of its anomalous kinetics in terms of multiple isoenzymes.
Int. J. Bioch. 6, 271-280 (1975)
- 79 Lipkin, M.:
Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells.
Physiol. Rev. 53, 891-915 (1973)
- 80 Loesche, W.J.:
Protein and carbohydrate composition of cecal contents of gnotobiotic rats and mice.
Proc. Soc. exp. Biol. (N.Y.) 128, 195-199 (1968)
- 81 Loeschke, K.:
Adaptative Änderungen von Resorptionsvorgängen, speziell des Natriumtransports, an einem hypertrophierenden Darmabschnitt.
Habilitationsschrift, Med. Fak. Univ. München 1974
- 82 Loeschke, K., Gordon, H.A.:
Water movement across the cecal wall of the germfree rat.
Proc. Soc. exp. Biol., 133, 1217-1222 (1970)
- 83 Loeschke, K., Müller, O.A.:
Hormones and the stimulated sodium transport in cecum hypertrophy.
Pflügers Arch. 355, 273-280 (1975)
- 84 Loeschke, K., Resch, W.:
Nucleic acid and protein content of rat cecum mucosa in dietary adaptation - growth by cellular hyperplasia.
Pflügers Arch., im Druck 1977
- 85 Loeschke, K., Uhlich, E., Halbach, R.:
Cecal enlargement combined with sodium transport stimulation in rats fed polyethylene glycol.
Proc. Soc. exp. Biol. Med., 142, 96-102 (1973)
- 86 Loeschke, K., Uhlich, E., Kinne, R.:
Stimulation of sodium transport and $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ activity in the hypertrophying rat cecum.
Pflügers Arch. 346, 233-249 (1974)

- 87 Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.:
Protein measurements with the folinphenol-reagent.
J. biol. Chem. 193, 265-275 (1951)
- 88 McCarthy, D.M., Kim, Y.S.:
Changes in sucrase, enterokinase, and peptide hydrolase
after intestinal resection.
The association of cellular hyperplasia and adaptation.
J. Clin. Invest. 52, 942-951 (1973)
- 89 Meeting Report: Titisee Conference 1976
Cyclic nucleotides as regulators of proliferation and
differentiated cell function.
J. cycl. Nucl. Res. 2, 189-204 (1976)
- 90 Menge, H., Robinson, J.W.L., Riecken, E.O.:
Anpassungsmöglichkeiten der Dünndarmschleimhaut an
verschiedene intraluminal Milieuveränderungen.
Zeitschr. für Gastroenterologie 14, 420-433 (1976)
- 91 Messier, B., Leblond, C.P.:
Cell proliferation and migration as revealed by radio-
autography after injection of thymidine-H³ into male
rats and mice.
Amer. J. Anat. 106, 247-284 (1960)
- 92 Minton, J.P. et al.:
Elevated adenosine 3':5'-cyclic monophosphate levels
in human and animal tumors in vivo.
J. Nat. Cancer Inst. 57, 39-41 (1976)
- 93 Mishra, N.K., Ryan, W.L., Chaudhuri, S.N.:
Elevation of the intracellular levels of cyclic adenosine
monophosphate during in vitro infection of transmissible
gastroenteritis virus.
Arch. Ges. Virusforsch. 41, 280-283 (1973)
- 94 Miyamoto, E., Kuo, J.F., Greengard, P.:
Cyclic-nucleotide-dependent protein kinases. III. Puri-
fication and properties of adenosine 3':5'-monophosphate-
dependent protein kinases from bovine brain.
J. biol. Chem. 244, 6395-6402 (1969)
- 95 Nundy, S., Chir., M., F.R.C.S., Malamud, D., Obertop, H.,
Szerban, J., Malt, R.A.:
Onset of cell proliferation in the shortened gut.
Colonic hyperplasia after ileal resection.
Gastroenterology, 72, 263-266 (1977)

- 96 Nuttal, G.H.F., Thierfelder, H.:
Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal.
II.Mitt.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 22, 62-73 (1896/97)
- 97 Obertop, H., Nundy, S., Chir. M., F.R.C.S., Malamud, D.,
Malt, R.A.:
Onset of cell proliferation in the shortened gut.
Rapid hyperplasia after jejunal resection
Gastroenterology, 72, 265-270 (1977)
- 98 Ogez, J.R., Segel, I.H.:
Interaction of cyclic adenosine 3':5'-monophosphate with
protein kinase. Equilibrium binding models.
J. biol. Chem. 251, 4551-4556 (1976)
- 99 Parkinson, D.K., Ebel, H., DiBona, D.D., Sharp, G.W.G.:
Localization of the action of cholera toxin on adenyl
cyclase in mucosal epithelial cells of rabbit intestine.
J. clin. Invest. 51, 292-2297 (1972)
- 100 Parsons, D.S., Paterson, C.R.:
Fluid and solute transport across rat colonic mucosa.
Quart. J. Exp. Physiol. 50, 220-231 (1965)
- 101 Perkins, J.P.:
Adenyl cyclase.
in: Advances cycl. Nucl. Res. 3, 1-64 (1973)
ed. by Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press,
New York
- 102 Porus, R.L.:
Epithelial hyperplasia following massive small bowel
resection in man.
Gastroent. 48, 737-753 (1965)
- 103 Powell, D.W.:
Intestinal conductance and permselectivity changes with
theophylline and choleragen.
Amer. J. Physiol. 227, 1436-1443 (1974)
- 104 Powell, D.W., Binder, H.J., Curran, P.F.:
Active electrolyte secretion stimulated by choleragen
in rabbit ileum in vitro.
Am. J. Physiol. 225, 781-787 (1973)
- 105 Powell, D.W., Farris, R.K., Carbonetto, S.T.:
Theophylline, cyclic AMP, choleragen, and electrolyte
transport by rabbit ileum.
Amer. J. Physiol. 227, 1428-1435 (1973)

- 106 Quill, H., Weiser, M.M.:
Adenylate and guanylate cyclase activities and cellular differentiation in rat small intestine.
Gastroenterology 69, 470-478 (1975)
- 107 Rall, T.W., Sutherland, E.W.:
Formation of a cyclic adenine ribonucleotide by tissue particles.
J. biol. Chem. 232, 1065-1076 (1958)
- 108 Rasmussen, H., Jensen, P., Lake, W., Friedman, N., Goodman, D.B.P.:
Cyclic nucleotides and cellular calcium metabolism.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 5, 375-394 (1974)
ed. by Drummond, G.I., Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York
- 109 Reimann, E.M., Brostrom, C.O., Corbin, J.D., King, C.A., Krebs, E.G.:
Separation of regulatory and catalytic subunits of the cyclic 3'.5'-adenosine monophosphate-dependent protein kinase(s) of rabbit skeletal muscle.
Biochem. biophys. Res. Comm. 42, 187-194 (1971)
- 110 Resch, W.:
Untersuchungen über den Nucleinsäuren- und Proteingehalt von Mucosazellen bei der "funktionellen Hypertrophie" des Rattencaecums.
Inaug. Diss. Med. Fak. Universität München (1974)
- 111 Robison, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W.:
Adenyl cyclase as an adenergic receptor.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 139, 703-723 (1967)
- 112 Robison, G.A., Butcher, R.W., Sutherland, E.W.:
Cyclic AMP.
Ann. Rev. Biochem. 37, 149-174 (1968)
- 113 Rodbell, M., Birnbaumer, L., Pohl, S.L.:
Colloquium on the role of adenyl cyclase and cyclic 3',5'-AMP in biological systems.
ed. by Rall, T.W., Rodbell, M., Condliffe, P., Fogarty Int. Center Wash. D.C., Gov. print. office (1971)
p. 59
- 114 Rodbell, M., Lin, M.C., Salomon, Y., Londos, C., Harwood, J.P., Martin, B.R., Rendell, M., Berman, M.:
Role of adenine and guanine nucleotides in the activity and response of adenylate cyclase systems to hormones: Evidence for multiple transition states.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 5, 3-30 (1974) ed. by Drummond, G.I., Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York

- 115 Rosensweig, N.S.:
Diet and intestinal enzyme adaptation: Implications
for gastrointestinal disorders.
Amer. J. clin. Nutr. 28, 648-655 (1975)
- 116 Rosensweig, N.S., Herman, R.H.:
Control of jejunal sucrase and maltase activity by
dietary sucrose or fructose in man.
J. Clin. Invest. 47, 2253-2262 (1968)
- 117 Rosensweig, N.S., Stifel, F.B., Herman, R.H., Zakim, D.:
The dietary regulation of the glycolytic enzymes.
II. Adaptive changes in human jejunum.
Biochim. Biophys. Acta 170, 228-234 (1968)
- 118 Ruoff, H.J., Sewing, K.F.:
Effect of adrenergic-stimulation on cyclic nucleotide
concentration in rat gastric-mucosa.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 293, R33, (1976)
- 119 Ryan, W.L., Heidrick, M.L.:
Role of cyclic nucleotides in cancer.
In: Adv. cycl. Nucl. Res. 4, 81-116 (1974)
ed. by Greengard, P., Robison, G.A., Raven Press, New York
- 120 Schiff, H.:
Induktion der Na-K-ATPase in den Plasmamembranen der
"funktionell hypertrophierenden" Caecummucosa der Ratte:
Spezifische Aktivität und Kinetik.
Inaug. Diss. Med. Fak. Universität München (1976)
- 121 Schiff, H., Loeschke, K.:
Induction of Na-K-ATPase in plasma membranes of rat
cecum mucosa by diet: time course and kinetics
Pflügers Arch., im Druck (1977)
- 122 Schlondorff, D., Weber, H.:
Cyclic nucleotide metabolism in compensatory renal
hypertrophy and neonatal kidney growth.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 73, 524-528 (1976)
- 123 Schramm, M., Selinger, Z.:
The functions of cyclic AMP and calcium as alternative
second messengers in parotid gland and pancreas.
J. cycl. Nucl. Res. 1, 182-192 (1975)
- 124 Schultz, G.:
Possible interrelations between calcium and cyclic
nucleotides in smooth muscle.
in: Asthma II: Physiology, immunopharmacology and treatment.
ed. by K.F. Austen and L.M. Lichtenstein. Acad. Press. N.Y.
and London (in press), 77-91 (1977)

- 125 Schultz, G., Böhme, E., Hardman, J.G.:
Separation and purification of cyclic nucleotides
by ion exchange resin.
Column Chromatography.
Meth. in Enzymology 38, 9-20 (1974)
- 126 Schultz, G., Böhme, E., Munske, K.:
Guanyl-cyclase. Determination of enzyme activity.
Life Sci. 8, Part II, 1323 (1969)
- 127 Schultz, G., Hardman, J.G.:
Regulation of cyclic GMP levels in the ductus deferens
of the rat.
in: Adv. cycl. Nucl. Res. 5, 339-352 (1974)
ed. by Drummond, G.I., Greengard, P., Robison, G.A.,
Raven Press, New York
- 128 Schultz, G., Schultz, K., Hardman, J.G.:
Effects of norepinephrine on cyclic nucleotide levels in
the ductus deferens of the rat.
Metabolism 24, 429-437 (1975)
- 129 Schultz, K.-D., Schultz, K., Schultz, G.:
Sodium nitroprusside and other smooth muscle-relaxants
increase cyclic GMP levels in rat ductus deferens.
Nature 265, 750-751 (1977)
- 130 Schultz, S.G., Frizzell, R.A., Nellans, H.N.:
Ion transport by mammalian small intestine.
Ann. Rev. Physiol. 36, 51-91 (1974)
- 131 Schwartz, C.J., Kimberg, D.V., Sheerin, H.E., Field, M.,
Said, S.I.:
Vasoactive intestinal peptide stimulation of adenylate
cyclase and active electrolyte secretion in intestinal
mucosa.
J. Clin. Invest. 54, 536-544 (1974)
- 132 Schwartz, C.J., Kimberg, D.V., Ware, P.:
Adenylate cyclase in intestinal crypt and villus cells:
stimulation by cholera enterotoxin and prostaglandin E₁.
Gastroenterology 68, 94-104 (1975)
- 133 Schwartz, A., Lindenmayer, G.E., Allen, J.C.:
The sodium-potassium adenosine triphosphatase:
Pharmacological, physiological and biochemical aspects.
Pharmacol. Rev. 27, 3-134 (1975)
- 134 Seifert, W.:
Cyclic nucleotides and cell growth.
J. supram. Structure 4, 279-287 (1976)

- 135 Sheerin, H.E., Field, M.:
Ileal HCO_3^- secretion: relationship to Na and Cl transport and effect of theophylline.
Amer. J. Physiol. 228, 1065-1074 (1975)
- 136 Silva, P., Charney, A.N., Epstein, F.H.:
Potassium adaptation and Na-K-ATPase activity in mucosa of colon.
Amer. J. Physiol. 229, 1576-1579 (1975)
- 137 Simon, B., Rieser, P., Kather, H.:
Adenylat-Cyclase und Dünndarmsekretion.
Inn. Med. 3, 276-282 (1976)
- 138 Skou, J.C.:
The (Na^+-K^+) -activated enzyme system and its relationship to transport of sodium and potassium.
Quart. Rev. Biophys. 7, 401-434 (1975)
- 139 Steiner, A.L., Ferrendelli, J.A., Kipnis, D.M.:
Radioimmunoassay for Cyclic Nucleotides.
III. Effect of ischemia, changes during development and regional distribution of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate in mouse brain.
J. biol. Chem. 247, 1121-1124 (1972)
- 140 Steiner, A.L., Parket, C.W., Kipnis, D.M.:
Radioimmunoassay for cyclic nucleotides. I. Preparation of antibodies and iodinated cyclic nucleotides.
J. biol. Chem. 247, 1106-1113 (1972)
- 141 Stifel, F.B., Rosensweig, N.S., Zakim, D., Herman, R.H.:
Dietary regulation of glycolytic enzymes. I. Adaptive changes in rat jejunum.
Biochim. Biophys. Acta 170, 221-227 (1968)
- 142 Sutherland, E.W., Butcher, R.W., Robison, G.A., Hardman, J.G.:
The role of adenosine 3':5'-monophosphate in hormone action.
18. Mosbacher Coll., Springer Verl. (1967)
- 143 Sutherland, E.W., Rall, T.W.:
Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.
J. biol. Chem. 232, 1077-1091 (1958)
- 144 Sutherland, E.W., Rall, T.W., Menon, T.:
Adenyl cyclase: I. Distribution, preparation, and properties.
J. biol. Chem. 237, 1220-1227 (1962)

- 145 Terasaki, W.L., Appleman, M.M.:
The role of cyclic GMP in the regulation of cyclic AMP hydrolysis.
Metabolism 24, 311-319 (1975)
- 146 Tilson, M.D., Sweeney, T., Wright, H.K.:
Compensatory hypertrophy of the ileum after gastro-duodenojejunal exclusion.
Arch. Surg. 110, 309-312 (1975)
- 147 Tilson, M.D., Wright, H.K.:
An adaptative change in ileal Na-K-ATPase activity after jejunectomy or jejunal transposition.
Surg. 70, 421-424 (1971)
- 148 Traber, J.:
Prostaglandinsynthese und Prostaglandinwirkung bei clonalen permanenten Zelllinien des Nervensystems.
Diploma Thesis 1973 LMU München
- 149 Tryzna, G.:
Der Einfluß cyclischer Nucleotide auf die elektrische Aktivität und den transepithelialen hydroosmotischen Nettowasserfluß isolierter Amphibienmembranen.
Inaug. Diss., Med. Fak. Universität Köln 1973
- 150 Ussing, H.H., Zerahn, K.:
Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.
Acta Physiol. Scand. 23, 110-127 (1951)
- 151 Weiser, M.M., Quill, H.:
Intestinal villus and crypt cell responses to cholera toxin.
Gastroenterology 69, 479-482 (1975)
- 152 Weser, E., Hernandez, M.H.:
Studies of small bowel adaptation after intestinal resection in the rat.
Gastroenterology 60, 69-75 (1971)
- 153 White, A.A., Aurbach, G.D.:
Detection of guanyl cyclase in mammalian tissues.
Biochim. biophys. Acta 191, 686-697 (1969)
- 154 Whitfield, J.F., Macmanus, J.P., Rixon, R.H., Boynton, A.L. Youdale, T., Swierenga, S.:
The positive control of cell-proliferation by interplay of calcium-ions and cyclic nucleotides.
in vitro 12, 1-18 (1976)
- 155 Zenser, T.V.:
Inhibition of cholera toxin-stimulated intestinal epithelial cell adenylate cyclase by adenosine analogs.
Proc. Soc. exp. Biol. Med. 152, 126-129 (1976)

Herrn Priv. Doz. Dr. K. Loeschke danke ich herzlich für die Überlassung des Themas, für seine ständige Bereitschaft, mich zu beraten und durch wertvolle Anregungen zu unterstützen.

Für die Einführung in die Bestimmungsmethoden von cAMP und cGMP und viele Ratschläge danke ich Herrn Prof. Dr. G. Schultz vom Pharmakologischen Institut Heidelberg.

Ebenso richtet sich mein Dank an Fräulein Ulla Kautz, deren engagierte Mithilfe von sehr großem Wert war.

Lebenslauf

Name: Rupert Gerzer
geboren am: 10. April 1950
in: Gars am Inn, Oberbayern

Eltern: Ferdinand und Elisabeth Gerzer, geb. Bleier
Vater verstorben 1951
Mutter wiederverheiratet seit 1952
mit Paul Ullrich

Schulen: 1956 - 1960 Volksschule, Gars am Inn
1960 - 1963 St. Alfons-Gymnasium, Gars am Inn
1963 - 1966 Reuchlin-Gymnasium, Ingolstadt
(humanistisch)
1966 - 1970 Ignaz-Günther-Gymnasium, Rosenheim
(humanistisch)

Abitur: 26.6.1970 Ignaz-Günther-Gymnasium, Rosenheim

Studium: 1970 - 1976 Medizin an der Universität München

Staatsexamen: 23.6.1976

Medizinal-
assistentenzeit: 1.11.76 - 28. 2.77 Chirurgie im Kreiskrankenhaus
Schrobenhausen
1. 3.77 - 30. 6.77 Innere Medizin in der Med.
Klinik Innenstadt der Uni-
versität München
1. 9.76 - 31.10.76 exp. Gastroenterologie
und Med. Klinik Innenstadt
1. 9.77 - 31.10.77 der Universität München

Approbation: 2.11.1977

Familienstand: seit 27.5.1977 verheiratet mit Franziska
Gerzer geb. Paulus

